ЭНДОРФИНЫ

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МИР

THE ENDORPHINS

Advances in Biochemical
Psychopharmacology
Volume 18

Editors

Erminio Costa, M. D.
Chief, Laboratory of Preclinical
Pharmacology
National Institute of Mental
Health-Saint Elisabeths Hospital
Washington, D. C.

Marco Trabucchi, M. D.
Professor of Pharmacology
Brescia Medical School
Brescia, Italy

Raven Press
New York

577.1
Э.64

ЭНДОРФИНЫ

Под редакцией Э. Коста, М. Трабукки

Перевод с английского
канд. биол. наук М. А. Панова

под редакцией
проф. В. Б. Розена

7768

БИБЛИОТЕКА
ВНИИТП

Издательство «Мир»
Москва 1981

УДК 577.1

Эндорфины: Пер. с англ./Под ред. Э. Коста, М. Трабукки. Перевод Панова М. А.; Под ред. и с предисл. В. Б. Розена — М.: Мир 1981. — 368 с. с ил.

Книга, написанная крупнейшими специалистами из Италии, США, ФРГ и других стран, работающими в области эндогенных нейропептидов (эндорфинов и энкефалинов), является первой сводкой данных о структуре, свойствах и функциях этих соединений. Биологическая роль эндорфинов и энкефалинов весьма разнообразна: они служат медиаторами, участвующими в гормональной регуляции обмена веществ и в процессах, связанных с болевыми ощущениями, сном, памятью и возникновением эмоций.

Предназначена для биохимиков, физиологов, фармакологов, эндокринологов, врачей.

Редакция литературы по биологии

2007020000

$Э\frac{21005-113}{041(01)-81}113-81$, ч. 1

© 1978 by Raven Press Books Ltd.
© Перевод на русский язык, «Мир» 1981

под ред. Эрминио Коста, Марко Трабукки

ЭНДОРФИНЫ

Ст. научный редактор Л. Г. Тер-Саркисян. Мл. редактор З. Е. Кожанова.
Художник Н. К. Уралова. Художественный редактор Б. Н. Юдкин.
Технический редактор Л. П. Ермакова. Корректор В. И. Постнова.

ИБ № 2543

Сдано в набор 17.04.81. Подписано к печати 07.07.81. Формат $60\times90^1/_{16}$.
Бумага книжно-журнальная. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 11,5 бум. л.
Усл. печ. л. 23. Усл. кр. отт. 23. Уч.-изд. л. 26,23. Изд. № 4/1138. Тираж 6000 экз. Зак. 1594.
Цена 3 р. 40 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., 1.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редактора перевода 5

Предисловие 7

Список авторов 9

Активные пептиды в нервной ткани. Исторические перспективы. (*Г. Цетлер*) 15

Химия регуляции нейропептидами. (*Р. Гайгер*) 35

Развитие концепций опиатных рецепторов и их лигандов. (*Г. В. Костерлиц, Д. Хьюс*) 43

Инактивация энкефалинов. Влияние очищенных пептидилдипептидаз и культивируемых клеток эндотелия человека. (*Е. Ж. Эрдос, А. Р. Джонсон, Н. Т. Бойден*) 56

Иммуногистохимическое распределение энкефалиновых нейронов. (*О. Йохансон, Т. Хёкфельт, Р. П. Эльде, М. Шульцберг, Л. Терениус*) . . . 61

Энкефалины и нейротензин. Иммуногистохимическая локализация и идентификация амигдалофугального тракта. (*Дж. Юл, Р. Гудмен, М. Кухар, С. Снайдер*) 79

β-Эндорфин. Локализация в клетке, электрофизиологические и поведенческие эффекты. (*Ф. Е. Блюм, Дж. Россье, Е. Л. Ф. Баттенберг, А. Байон, Е. Френч, С. Дж. Хенриксен, Г. Р. Сиггинс, Д. Сегал, Р. Браун, Н. Линг, Р. Гуиллемин*) 97

Нейроны, содержащие энкефалин и вещество Р в тройничной и экстрапирамидной системах. (*А. К. Куелло*) 118

Эндорфины. β-ЛПГ и АКТГ: биохимическое, фармакологическое и анатомическое исследование. (*Х. Акил, С. Уотсон, Ф. Бергер, Дж. Барчас*) 131

Использование жидкостной хроматографии под высоким давлением для изучения энкефалинов. (*Дж. Л. Мик, Т. П. Бохан*) 148

Энкефалины мозга крыс. Распределение и биосинтез. (*Х.-Ю. Т. Янг, Дж. С. Хонг, В. Фратта, Е. Коста*) 155

Радиоиммунологический тест на энкефалины. Содержание метионин- и лейцин-энкефалина в мозгу морфинозависимых и поврежденных каиновой кислотой крыс. (*С. Р. Чайлдерс, Р. Шварц, Дж. Т. Койл, С. Х. Снайдер*) 165

Некоторые взаимоотношения между эндорфинами и гормонами гипофиза. (*А. Сантагостино, Д. Коччи, Г. Джианьони, Е. Гори, Е. Мюллер, С. Ферри*) 178

Дальнейшее изучение природы и функции гипофизарных эндорфинов. (*Б. М. Кокс, Е. Р. Бейзман, Тсун-пинг Су, О. Г. Осман, А. Голдстайн*) 185

Участие гипоталамических эндорфинов в контроле выделения пролактина. (*А. Гайдотти, Л. Грэндисон*) 192

Влияние энкефалинов на метаболизм катехоламинов в центральной нервной системе крыс. (*С. Алгери, Н. Брунелло, Ц. Кальдерини, А. Консолациони*) 200

Некоторые фармакологические свойства FK33-824, стабильного, активного при пероральном введении аналога метионин-энкефалина. (*Р. Ц. Хилл, Д. Рёмер, Х. Х. Бюшер*) 212

Взаимодействие между энкефалинэргическими и другими нейронными системами. (*Е. Коста, В. Фратта, Дж. С. Хонг, Ф. Морони, Х.-Ю. Т. Янг*) 217

Стриато-церебеллярный тракт, контролирующий содержание циклического GMP в мозжечке. Роль дофамина, гамма-аминомасляной кислоты и энкефалинов. (*Ж. Биггио, М. Ж. Корда, М. Казу, Г. Л. Гесса*) . . 228

Эндорфины и рецепторы эндорфинов в стриатуме, связь с дофаминэргическими нейронами. (*Ж. Шварц, А. Поллард, С. Ллоран, Б. Мальфрой, С. Грос, Ф. Прадельс, Ф. Драй*) 243

Синаптическая локализация опиатных рецепторов в стриатуме крыс. (*А. Каренци, В. Фриджени, Д. Делла Белла*) 264

Опиатные рецепторы. Различное сродство к лигандам в разных участках мозга. (*Д. Делла Белла, Ф. Казаччи, А. Сасси*) 270

Действие морфина и β-эндорфина на синтез РНК. (*Н. М. Ли, Г. Г. Ло, Ч.-Х. Ли*) 277

Сравнительные исследования морфина и метионин-энкефалина in vivo и in vitro. Зависимый от генотипа ответ у двух различных линий мышей. (*Г. Раканьи, Ф. Бруно, Е. Юлиано, Д. Лонжиаве, В. Манделли, Ф. Берти*) 286

Эндорфины мозга и ощущение хорошего самочувствия: психобиологическая гипотеза. (*Л. Стайн, Дж. Беллуци*) 294

Характеристика опиатоподобных соединений в крови и моче. (*М. Вюстер, П. Лот, Р. Шульц*) 308

Роль эндорфинов в эндогенном обезболивании. (*Л. Терениус*) 315

Указывают ли поведенческие эффекты эндорфинов на их участие в психических расстройствах? (*А. Герц, Дж. Блёзиг, Г. Эмрих, К. Кординг, С. Пири, А. Кёллинг, Д. Церсен*) 326

β-Эндорфин. Субъективные и объективные эффекты при острой наркотической абстиненции у человека. (*Д. Кэтлин, К. К. Хьюи, Г. Ло, Ч.-Х. Ли*) 333

Опосредуют ли эндорфины акупунктурную анальгезию? (*Б. Померанц*) 344

Влияние налоксона на вызываемую акупунктурой анальгезию у наркоманов. (*Е. Малиция, Дж. Андреуччи, Р. Сербо, Дж. Коломбо*) . . . 354

Морфиноподобные факторы в спинномозговой жидкости пациентов с головными болями. (*Ф. Сикутери, Б. Ансельми, Ц. Курради, С. Мичелацци, А. Сасси*) 357

Предметный указатель 361

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Опиоидные пептиды мозга (эндорфины и энкефалины) представляют собой новый класс биоорганических соединений, выполняющих в организме роль межклеточных и межтканевых нейрорегуляторов. Необычайно широкий и пристальный интерес, проявляемый к этим соединениям со стороны исследователей самого различного профиля, обусловлен целым рядом обстоятельств. Прежде всего, эндогенные опиоиды — особая группа нейромедиаторов и нейромодуляторов, специализированных в отношении небольших групп нейронов головного и спинного мозга, физиологическая функция которых, по-видимому, сводится к обеспечению анальгетических эффектов, а также деятельности экстрапирамидной, лимбической и нейроэндокринной систем. Открытие эндорфинов и энкефалинов, таким образом, создало предпосылки для формирования новых направлений в области физиологии мозга. Вместе с тем изучение физиологических функций эндогенных опиоидов обусловило развитие широкого фронта исследований по выяснению их роли в патогенезе психических и неврологических расстройств у человека. Кроме того, открытие и изучение свойств эндорфинов определило стремление химиков и фармакологов создать их синтетические аналоги, которые воспроизводили бы в чистом виде, без осложнений стойкий анальгетический эффект. В настоящее время получены десятки таких аналогов, причем некоторые из них по важнейшим фармакодинамическим и фармакокинетическим параметрам превосходят морфин. Дополнительным стимулом для проводимых исследований явилось предположение об участии эндогенных опиоидов в механизме реализации таких терапевтических обезболивающих воздействий, как акупунктура, гипноз и другие.

Еще один интереснейший аспект проблемы эндогенных опиоидов — исследование особенностей их биосинтеза. Установлено, что эндорфины (β, γ и α) и мет-энкефалины представляют собой фрагменты аденогипофизарного гормона β-липотропина. Можно полагать, что эти морфиноподобные соединения, по крайней мере отчасти, являются продуктами многостадийного ограниченного протеолиза липотропина, т. е. имеют гормональное происхождение. Следует напомнить, что β-липотропин — вероятный предшественник эндорфинов и мет-энкефалина — образуется в свою очередь из прегормонального белка аденогипофиза (молекулярная масса примерно 31 000), из которого образуется также АКТГ. Интересно, что из β-липотропина наряду с эндорфинами и мет-энкефалином формируются β-МСГ и стимулятор запоминания, а из АКТГ — α-МСГ, регулятор секреции инсулина и тот же стимулятор запоминания. Таким образом, последовательный специфический протеолиз одного прегормонального белка гипофиза служит источником целого семейства пептидов с различными видами физиологической активности. Важно отметить, что значительная часть опиоидов мозга представлена лей-энкефалином, предшественники и механизмы синтеза которого до настоящего времени не установлены.

Выявление общности биогенеза гормонов аденогипофиза и эндогенных опиоидов, с одной стороны, установило новую форму взаимодействий нервной и эндокринной систем, с другой — поставило перед исследователями весьма важный вопрос о способах дифференциальной регуляции протеолитического образования различных гормональных и медиаторных олигопептидов из единого предшественника в разных структурах мозга и нижнего мозгового придатка. С последним же обстоятельством тесно связан интересный вопрос о механизмах дискриминированной рецепции различных опиоидных соединений разными группами избирательно реактивных к ним нейронов.

Все сказанное позволяет думать, что предлагаемая вниманию советских читателей монография «Эндорфины» весьма полезна и своевременна. Монография представляет собой капитальную сводку современных данных по проблеме эндогенных опиоидов, составленную крупными специалистами в этой новой области исследований. Книга состоит из 32 статей, посвященных соответственно химической структуре эндорфинов и энкефалинов; путям их биосинтеза; методам выявления и количественного анализа опиоидов; их локализации и особенностям циторецепции в различных структурах мозга; различным физиологическим эффектам природных опиоидных соединений, их синтетических аналогов и специфических антагонистов, а также некоторых других олигопептидов мозга; возможной роли морфиноподобных факторов в генезе психических и невропатологических расстройств и реализации обезболивающего действия иглоукалывания. Почти в каждой статье обстоятельно представлена методическая часть выполненных исследований. Таким образом, в монографии достаточно полно, на современном уровне и с различных сторон рассмотрены наиболее актуальные аспекты и тенденции проблемы эндогенных пептидов — эндорфинов. По-видимому, данная книга является в настоящее время наиболее полным обобщением исследований по рассматриваемой проблеме. Представленные в ней сведения, с нашей точки зрения, могут вызвать значительный интерес у широкого круга биологов и медиков.

Проф. В. Б. Розен

ПРЕДИСЛОВИЕ

Существование в нервной ткани специфических опиатных рецепторов, связывающих морфин и другие опиаты со сродством, пропорциональным их анальгезирующей активности, свидетельствует о том, что эндогенные лиганды для этих рецепторов могут запасаться в нейронах и выступать в роли предполагаемых нейромедиаторов. Честь создания основополагающих работ в этой области принадлежит А. Голдстайну, Дж. Хьюсу, Х. Костерлицу, С. Снайдеру, Л. Терениусу и их сотрудникам. В исследованиях Дж. Хьюса и Х. Костерлица были идентифицированы два пентапептида нервных тканей, играющие роль эндогенных лигандов для опиатных рецепторов. В соответствующих статьях данного издания будут рассмотрены исторические основы и научная логика исследований, обусловивших открытие этих двух энкефалинов. В мозгу обнаружены и другие эндогенные лиганды для опиатных рецепторов; все эти лиганды, в том числе и открытые Хьюсом и Костерлицем энкефалины, получили название *эндорфинов*. Все эндорфины являются полипептидами. β-Эндорфин, содержащийся в гипоталамусе и в гипофизе, характеризуется более высокой чем у мет-энкефалина молекулярной массой, и представляет собой фрагмент β-липотропина — другого полипептида, также обнаруживаемого в гипофизе и гипоталамусе. И хотя мет-энкефалин, β-эндорфин и β-липотропин химически сходны между собой, нет оснований считать, что β-липотропин в тканях мозга является обязательным предшественником β-эндорфина или мет-энкефалина.

Как показано в соответствующих статьях данного издания (доктор Блюм и его сотрудники, а также доктор Акил и сотрудники), нейроны, запасающие β-эндорфин, локализованы главным образом в гипоталамусе; в отличие от этого, нейроны, запасающие мет-энкефалин, распределены по разным участкам мозга (Иохансcон и др., данное издание). Так, например, энкефалины присутствуют в системе внутренних интернейронов полосатого тела (Янг и др., а также Куелло, данное издание), запасаются в амигдалофугальном тракте (Юл и др., данное издание) и локализованы в небольших группах нейронов; такие «микроядра» энкефалинэргических нейронов присутствуют в различных участках ствола мозга (Иохансcон и др., Юл и др., данное издание). Хотя в вопросе о физиологической роли энкефалинов еще много неясного, есть все же основания думать, что эти пептиды модулируют болевые восприятия и, кроме того, участвуют в регуляции экстрапирамидной, лимбической системы и нейроэндокринных функций. Эндорфины, подобно катехоламинам, представляют собой, вероятно, семейство нейромедиаторов, имеющих очень важное значение. Следует, однако, сказать, что их нейрофизиологическая функция в точности еще не установлена; исходя из данных, приведенных в нашей монографии, можно лишь строить предположение об их физиологической роли в функционировании различных трактов эндорфинэргических нейронов. Проблемы, связанные с метаболизмом, физиологией и патофизиологией эндокринов, задают нейробиологам новые загадки. В данной монографии, посвященной эндорфинам, приведены труды ученых, внесших вклад в разрешение этих загадок; здесь представлены самые последние данные о физиологической, фармакологической и патогенной роли эндорфинов.

Нам приятно отметить предусмотрительность вновь основанной Медицинской школы в Бреше, организовавшей этот симпозиум по эндорфинам (Бреша, Италия, 28—30 августа 1977 г.). Мы также очень признательны профессору Р. Паолетти, президенту фонда Лоренцини в Милане (Италия), за проявленный им интерес к рассматриваемой проблеме, за предоставленные нам чрезвычайно ценные научные консультации и за финансовую поддержку симпозиума.

Е. Коста
М. Трабукки

СПИСОК АВТОРОВ

Huda Akil
Nancy Pritzker Laboratory of Behavioral Neurochemistry. Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305

S. Algeri
Instituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Via Eritrea 62, 20157 Milan, Italy

G. Andreucci
Toxicological Clinic, Anesthesiology and Resuscitation Institute, University of Rome, Rome, Italy

B. Anselmi
Department of Clinical Pharmacology, University of Florence, 50134 Florence, Italy

E. R. Baizman
Addiction Research Center, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California 94304

Jack D. Barchas
Nancy Pritzker Laboratory of Behavioral Neurochemistry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California 94304

E. L. F. Battenberg
A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

A. Bayon
A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

J. D. Belluzzi
Department of Psychopharmacology, Wyeth Labs, Philadelphia, Pennsylvania 19101

Philip A. Berger
Nancy Pritzker Laboratory of Behavioral Neurochemistry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California 94304

F. Berti
Institute of Pharmacology and Pharmacognosy, University of Milan, 20129 Milan, Italy

G. Biggio
Institute of Pharmacology, University of Cagliari, Cagliari, Italy

G. Blasig
Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

F. E. Bloom
A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

Timothy P. Bohan
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

N. T. Boyden

Department of Pharmacology, University of Texas Health Science Center at Dallas, Dallas, Texas 75235

R. Browne
Department of Psychiatry, University of California at San Diego, La Jolla, California 92037

N. Brunello
Instituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Via Eritrea 62, 20157 Milan, Italy

F. Bruno
Institute of Pharmacology and Pharmacognosy, University of Milan, 20129 Milan, Italy

H. H. Buescher
Medical and Biological Research Department, Sandoz A. G. 4002, Basel, Switzerland

G. Calderini
Instituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Via Eritrea 62, 201157 Milan, Italy

A. Carenzi
Zambon S. p. A. Research Laboratories, 20091 Bresso, Milan, Italy

F. Casacci
Zambon S. p. A. Research Laboratories, 20091 Bresso, Milan, Italy

Don H. Catlin
Department of Pharmacology, University of California, Los Angeles, California 90024.

R. Cerbo
First Mental and Nervous Disease Clinic, University of Rome, Rome, Italy

S. R. Childers
Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins University Medical School, Baltimore, Maryland 21205

D. Cocchi
Institute of Pharmacology, Faculty of Science and Medicine, University of Milan, Italy

G. Colombo
Toxicological Clinic, Anesthesiology and Resuscitation Institute, University of Rome, Rome, Italy

A. Consolazione
Istituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Via Eritrea 62, 20157 Milan, Italy

C. Cording
Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

E. Costa
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

W. M. Cox
Addiction Research Foundation, Stanford University Medical School, Palo Alto, California 94304

J. T. Coyle
Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins University Medical School, Baltimore, Maryland 21205

A. Claudio Cuello
MRC Neurochemical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Hills Road, Cambridge CB2 2QD England

C. Curradi
Department of Clinical Pharmacology, University of Florence, 50134 Florence. Italy

D. Della Bella
Zambon S. p. A. Research Laboratories, 20091 Bresso, Milan, Italy

F. Dray

Unite de Radioimmunologie Analytique, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

R. P. Elde
Department of Histology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

H. M. Emrich
Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

E. G. Erdös
Department of Pharmacology and Internal Medicine, University of Texas Health Science Center at Dallas, Dallas, Texas 75235

S. Ferri
Institute of Pharmacology and Pharmacognosy, University of Catania, Catania, Italy

W. Fratta
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

E. French
A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

V. Frigeni
Zambon S. p. A. Research Laboratories, 20091 Bresso, Milan, Italy

R. Geiger
Hoechst Aktiengesellschaft, D 6230, Frankfurt 80, Germany

G. Giagnoni
Institute of Pharmacology, Faculty of Science and Medicine, University of Milan, Italy

Avram Goldstein
Addiction Research Center, Stanford University Medical School, Palo Alto, California 94304

Robert R. Goodman
Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins Medical School, Baltimore, Maryland 21205

E. Gori
Institute of Pharmacology, Faculty of Science and Medicine, University of Milan, Milan, Italy

L. Grandison
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hopsital, Washington, D. C. 20032

C. Gros
Unit é de Radioimmunologie Analytique, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

A. Guidotti
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

R. Guillemin
Neuroendocrinology Laboratory, Salk Institute, La Jolla, California 92037

S. J. Henriksen
A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

A. Herz
Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

R. C. Hill
Medical and Biological Research Department, Sandoz A. G., 4002 Basel, Switzerland

T. Hökfelt
Department of Histology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

J. S. Hong

Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

J. Hughes
Unit for Research on Addictive Drugs, University of Aberdeen, Marischal College, Aberdeen, AB9 1AS, Scotland

Ka Kit Hui
Department of Medicine, University of California, Los Angeles, California 90024

E. Iuliano
Institute of Pharmacology and Pharmacognosy, University of Milan, 20129 Milan, Italy

O. Johansson
Department of Histology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

A. R. Johnson
Department of Pharmacology, University of Texas Health Science Center at Dallas, Dallas, Texas 75235

A. Kölling
Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

H. W. Kosterlitz
Unit for Research on Addictive Drugs, University of Aberdeen, Marischal College, Aberdeen, AB9 1AS, Scotland

M. J. Kuhar
Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins Medical School, Baltimore, Maryland 21205

Nancy M. Lee
Department of Pharmacology, University of California, San Francisco, California 94143

Choh Hao Li
Hormone Research Laboratory, University of California, San Francisco, California 94143

N. Ling
Neuroendocrinology Laboratory, Salk Institute. La Jolla, California 92037

C. Llorens
Unité 109 de Neurobiologie, Centre Paul Broca de l'I.N.S.E.R.M., 2ter rue d'Alesia, 75014 Paris, France

Horace H. Loh
Departments of Pharmacology and Psychiatry, University of California, San Francisco, California 94143

D. Longiave
Institute of Pharmacology and Pharmacognosy, University of Milan, 20129 Milan, Italy

Petra Loth
Department of Neuropharmacology, Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

B. Malfroy
Unité 109 de Neurobiologie, Centre Paul Broca de l'I.N.S.E.R.M., 2ter rue d'Alesia, 75014 Paris, France

E. Malizia
Toxicological Clinic, Anesthesiology and Resuscitation Institute, University of Rome, Rome, Italy

V. Mandelli
Carlo Erba Research Institute, 20158 Milan, Italy

James Meek
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

S. Michelacci
Department of Clinical Pharmacology, University of Florence, 50134 Florence, Italy

F. Moroni

Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

E. Müller

Institute of Pharmacology, Faculty of Science and Medicine, University of Milan, Milan, Italy

Osman Hassan Osman

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Khartoum, Khartoum, Sudan

S. Pirée

Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

H. Pollard

Unité 109 de Neurobiologie Centre, Paul Broca de l'I.N.S.E.R.M., 2ter rue d'Alesia, 75014 Paris, France

D. Roemer

Medical and Biological Research Department, Sandoz A. G., 4002 Basel, Switzerland

Bruce Pomeranz

Department of Zoology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

Ph. Pradelles

Unite de Radioimmunologie Analytique, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

G. Racagni

Institute of Pharmacology and Pharmacognosy, University of Milan, 20129 Milan, Italy

J. Rossier

A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

A. Santagostino

Institute of Pharmacology, Faculty of Science and Medicine, University of Milan, Milan, Italy

A. Sassi

Zambon S. p. A. Research Laboratories, 20091 Bresso, Milan, Italy

M. Schultzberg

Department of Histology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Rüdiger Schulz

Department of Neuropharmacology, Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

R. Schwarcz

Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins University Medical School, Baltimore, Maryland 21205

J. C. Schwartz

Unite 109 de Neurobiologie, Centre Paul Broca de l'I.N.S.E.R.M., 2ter rue d'Alesia, 75014 Paris, France

D. Segal

Department of Psychiatry, University of California at San Diego, La Jolla, California 92037

F. Sicuteri

Department of Clinical Pharmacology, University of Florence, 50134 Florence, Italy

G. R. Siggins

A. V. Davis Center for Behavior Neurobiology, The Salk Institute, La Jolla, California 92037

S. H. Snyder

Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins University Medical School, Baltimore, Maryland 21205

L. Stein

Department of Psychopharmacology, Wyeth Labs, Philadelphia, Pennsylvania 19101

Tsung-ping Su
Addiction Research Center, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California 94304

L. Terenius
Departtment of Medical Pharmacology, Uppsala University, Uppsala, Sweden

G. R. Uhl
Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Johns Hopkins Medical School, Baltimore, Maryland 21205

Stanley J. Watson
Nancy Pritzker Laboratory of Behavioral Neurochemistry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305

Michael Wüster
Department of Neuropharmacology, Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

H.-Y. T. Yang
Laboratory of Preclinical Pharmacology, National Institute of Mental Health, Saint Elizabeths Hospital, Washington, D. C. 20032

D. V. Zerssen
Max Planck Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, 8000 München 40, Germany

G. Zetler
Department of Pharmacology, Medical School of Lübeck, D 2400 Lübeck, Federal Republic of Germany

АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ В НЕРВНОЙ ТКАНИ. ИСТОРИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Г. ЦЕТЛЕР

(G. Zetler)

Лекция об исторических перспективах проблемы, обсуждаемой на этом симпозиуме, не может строго следовать теме «Эндорфины», которая близка участникам симпозиума и которой посвящено несколько опубликованных сравнительно недавно обзоров [53, 56, 182, 183]. В результате сопоставления пептидной природы опиоидов, с одной стороны, и взаимозависимости механизмов и структур мозга — с другой, возникло общее представление о фармакологически активных пептидах, присутствующих в нервной системе. В течение шести последних лет в области изучения таких соединений сделаны большие успехи, а исследования природных опиоидных пептидов усилили развитие этого направления в нейробиологии.

В нервной системе обнаруживается более 20 фармакологически активных пептидов и факторов, имеющих, по-видимому, пептидную природу. Однако быстрому развитию этой области исследования предшествовал длительный период затишья, и многие соединения были обнаружены лишь в течение последнего десятилетия. Принимая во внимание принципиальную возможность многообразия мыслимых пептидов и существование в мозгу многочисленных белков [13] и простых пептидов [173], можно думать, что список обнаруженных активных пептидов будет все более и более увеличиваться. Кажущаяся опасность «проглядеть» какие-либо важные пептидные соединения [159] из-за их низкой концентрации в тканях преодолевалась использованием на ранних стадиях исследования фармакологических, а не биохимических критериев их присутствия.

Нейрогормоны гипоталамуса. Преобладают ли не нервные функции?

Термин «нейрогормон» отражает то характерное для эндокринологии правило, что образование того или иного активного соединения и его действие пространственно разобщены, т. е. происходят в различных участках, соединенных между собой транспортным механизмом. В соответствии с этим мозг, или, точнее, гипоталамус, не может служить мишенью для окситоцина, вазопрессина и факторов, регулирующих функции аденогипофиза. Однако, как недавно было показано, правило это соблюдается не во всех случаях.

ОКСИТОЦИН И ВАЗОПРЕССИН

Окситоцин и вазопрессин — первые активные пептиды, обнаруженные в нервной ткани. В 1924 г. Абель [1] показал, что они содержатся в экстрактах инфундибулярной зоны, а в 1928 г. Тренделенберг [200] и Сато [175] подтвердили это. В течение многих лет наличие вазопрессина и окситоцина в ткани мозга ставилось под сомнение, пока Мелвилл и Хейр [126] не обнаружили вазопрессина в области супраоптического ядра. Тем не менее источником этих гормонов считали нейрогипофиз, а их присутствие в гипоталамусе объясняли обратным транспортом через гипоталамо-нейрогипофизарный тракт и(или) спинномозговую жидкость кармана воронки. Концепция такого транспортного механизма была предложена Коллином [24, 25] в 1928 г. и получила название «нейрокринно-гипофизарная». Природа взаимосвязи между гипоталамусом и нейрогипофизом была установлена в результате работ Шеррера [176], исследовавшего морфологию нейросекреции, и Баргмана [5], изучавшего структурные связи между нейрогипофизом и супраоптическим и паравентрикулярным ядрами. Экстракты всех отделов гипоталамо-нейрогипофизарной системы обладали окситоциновой и антидиуретической активностями [64, 65], что говорило о гипоталамическом происхождении этих гормонов. Убедительные данные об образовании окситоцина и вазопрессина в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах и центробежного транспорта окрашиваемого нейросекреторного материала и обоих гормонов были получены в опытах на обезвоженных собаках [66]. Примерно в это же время была выяснена химическая структура вазопрессина [201]. Это была первая работа в области химии пептидных гормонов, и она дала ответ на вопрос: одно, два или три вещества ответственны за окситоциновый, антидиуретический и вазопрессорный эффекты?

В настоящее время ни у кого не возникает сомнения в том, что окситоцин и вазопрессин, так же как и их нейрофизины, синтезируются, транспортируются и высвобождаются нейронами супраоптического и паравентрикулярного ядер [213]. Однако «нейрокринная» концепция, или ее модификация, называемая «гидроэнцефалокринной», несомненно, устарела, и мы рассмотрим ее позднее. Окситоцин и вазопрессин либо вообще не оказывают прямого действия на одиночные центральные нейроны, либо это действие выражено слабо. Исключение составляют клетки паравентрикулярного ядра, сильно стимулируемые окситоцином [133], и клетки супраоптического ядра, активность которых тормозится вазопрессином [140]. Следовательно, для этих пептидов более характерно действие вне нервной системы. Однако в фармакологических исследованиях поведения наметились новые аспекты действия этих гормонов. В опубликованном недавно обзоре делается вывод, что «вазопрессин играет определенную роль в физиологии памяти» [33].

ЛИБЕРИНЫ ГИПОТАЛАМУСА

Рассматривая центральный контроль активности передней доли гипофиза, Харрис [60] проанализировал результаты 366 исследований и пришел в 1960 г. к следующему выводу; вероятнее всего, что «нервные волокна гипоталамуса высвобождают в первичное сплетение сосудов воротной системы в области срединного возвышения некое гуморальное вещество (или вещества), которое затем перемещается в pars distalis гипофиза и там осуществляет контролирующее действие». Действительно, несколькими годами раньше в опытах in vitro было установлено существование биогенного фактора центрального происхождения, который стимулирует высвобождение АКТГ из ткани передней доли гипофиза [57, 170]. С тех пор в результате многочисленных исследований было обнаружено восемь регуляторных факторов гипоталамуса (см. обзоры [160, 207]). Многие из этих факторов, если не все, имеют пептидную природу [169]. Отсюда вытекает, что компетентные нейроны гипоталамуса передают свои стимулирующие или тормозные сигналы с помощью специфических пептидов, т. е. пептидэргическим путем.

У768

В последние годы исследования гипофизотропных факторов развивались в трех направлениях. Во-первых, оказалось, что на пептидэргическую гипоталамо-переднегипофизарную регуляцию оказывают влияние моноамины, причем эта регуляция может быть изменена воздействием лекарственными средствами, обладающими сродством к рецепторам аминов или вмешивающимися в их метаболизм [34].

Во-вторых, с помощью чувствительных радиоиммунологических и иммуногистохимических методов были выявлены тиролиберин, люлиберин и соматостатин вне гипоталамуса, а именно в коре, миндалевидном ядре, спинном мозгу и спинномозговой жидкости [106, 122, 218]. 31% общего содержания тиролиберина в мозгу крысы обнаруживается вне гипоталамуса, в участках мозга, богатых катехоламинами и, как полагают, играющих важную роль в эмоциональном поведении [219]. Постулировано, что первичным участком образования и распространения этих пептидов является гипоталамус [122]. Однако этому выводу противоречат результаты опытов, показавших, что деафферентация гипоталамуса индуциру-

БИБЛИОТЕКА
ВНИИТГП

ет снижение соматостатиноподобной активности только в гипоталамусе, но не в других участках мозга [15].

И в-третьих, было показано, что эти пептиды, несомненно, способны оказывать не только гипофизотропное действие [218]. При микроионофоретической аппликации тиролиберин и соматостатин подавляют активность нейронов в клиновидном ядре, в коре больших полушарий и мозжечка и в гипоталамусе. Далее, тиролиберин и соматостатин в фармакологических экспериментах влияют на поведение и моторную активность животных и изменяют эффекты лекарственных препаратов с хорошо известным центральным действием [27, 96, 104, 105, 127, 132, 163, 172, 214].

Таким образом оказывается, что в отличие от окситоцина и вазопрессина регуляторные факторы гипоталамуса выполняют в самой центральной нервной системе по крайней мере столь же важные физиологические функции, как и вне ее, т. е. в передней доле гипофиза. Вполне возможно, что в будущем эти соединения будут использоваться для лечения нервных и психических заболеваний, таких, как паркинсонизм, депрессия и алкоголизм [156].

Другие нейропептиды. Преобладают ли нервные функции?

ВЕЩЕСТВО Р

Вещество Р было первым из обнаруженных пептидов этого типа. Оно было открыто в 1931 г. Эйлером и Гаддумом [43] при исследовании ацетилхолина в тканевых экстрактах. Тем не менее определение химической структуры вещества Р и ее подтверждение путем синтеза было осуществлено лишь спустя 40 лет [23, 199]. По иронии судьбы многие исследования вещества Р были стимулированы такими его фармакологическими эффектами, которые не связаны с нервными функциями — резистентным к атропину сокращением кишки, расширением сосудов и слюноотделением (см. обзоры [59, 109, 112, 113, 139, 152]).

Исследования, проведенные в последние годы с использованием специфических радиоиммунологических и иммуногистохимических методов подтвердили старые данные, полученные методом биоиспытаний, о неравномерном распределении вещества Р в нервной системе — с удивительно высокой концентрацией в задних корешках [111, 188] и наиболее высокой концентрацией в substantia nigra [16, 39, 87, 157, 232, 233]. Подтвердились и результаты более ранних работ на опухолях мозга [54], свидетельствующие о локализации вещества Р в нервных клетках, но не в глиальной ткани [67—70]. Нашли подтверждение [69, 189] также данные о переносе вещества Р вдоль аксона [71]. Старые и новые данные свидетельствуют о высвобождении вещества Р из нервных тканей, т. е.

из коры головного мозга [179], спинного мозга [3, 143, 158], гипоталамуса [85, 197, 198], substantia nigra [84] и нервных окончаний [177]. Многочисленные работы последних лет [38, 155] подтверждают более ранние наблюдения о субклеточной локализации вещества Р в нервных окончаниях.

Исходя из характера распределения вещества Р в нервной системе, Лембек [111] пришел в 1953 г. к выводу о том, что вещество Р может быть медиатором первого сенсорного нейрона. Вещество Р оказывается эффективным стимулятором мотонейронов спинного мозга и нейронов кортикальных структур и клиновидного ядра [63, 94, 103, 154]. Эти данные, а также избирательная чувствительность ноцицептивных нейронов [62] также свидетельствуют в пользу физиологической роли вещества Р в сенсорных процессах. Более того, чистое вещество Р модулирует возбудимость α-мотонейронов, причем его действие противоположно действию морфина [99]. Эти факты по-новому освещают старые данные о том, что неочищенный препарат вещества Р обладает гиперальгезирующим действием и неконкурентно подавляет обезболивающее действие морфина у мышей [186, 222, 231]. В результате было выдвинуто предположение о возможной связи метаболизма вещества Р в нервной системе с толерантностью к морфину [222]. Однако синтетическое вещество Р оказывается эффективным анальгезирующим средством у мышей [120, 187], хотя оно не обладает сродством к морфиновым рецепторам в синаптических плазматических мембранах мозга крыс [192] или в vas deferens мышей [77]. В связи с этим рассматривалась возможность существования более чем одного типа морфиновых рецепторов и некоторых других механизмов [98, 187]. В настоящее время нельзя сказать, обусловлено ли обезболивающее действие неочищенного препарата вещества Р какими-либо пептидными примесями, такими, как фракция Fc (см. ниже). В связи с тем что многие лекарственные препараты центрального действия неспецифически противодействуют болеутоляющему действию морфина [231], важно указать на антианальгезирующее действие β-меланоцитстимулирующего гормона [97], производных вазопрессина [101], АКТГ-подобных пептидов [217] и экстрактов мозга, содержащих «антэндорфин» аргинин-энкефалин [205]. Соматостатин представляет собой другой пептид, рассматриваемый как эндогенный антагонист эндорфиновой системы [193]. Следовательно, ощущение боли может контролироваться балансом целого ряда нейропептидов, в связи с чем мы и рассмотрим сейчас опиоидные пептиды.

ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДЫ

Обнаружение эндогенных опиоидных пептидов, т. е. эндорфинов и энкефалинов [77, 115, 147, 194, 196], явилось результатом скорее дедукции, чем озарения, поскольку в его основе лежат исследования морфиновых рецепторов в нервной системе и идея о необходимости существования эндогенных лигандов для этих стереоспецифических рецепторов (см. обзоры [53, 56, 182, 183]). Очевидно, что многочисленные открытия в этой новой области стимулировали исследования анальгезии, наркомании и даже акупунктуры (иглоукалывания), эффект которой подавляется налоксоном и которая, как полагают, вызывает «выделение эндогенных веществ, обладающих наркотическим и обезболивающим действием» [123]. Новые перспективы обозначились, когда было показано, что эндорфины помимо способности оказывать обезболивающее действие влияют также и на поведение крыс [12, 83, 88, 128, 153, 212]. В опытах с крысами, вводившими себе мет- и лей-энкефалины, было установлено, что эти соединения обладают эйфорогенными и подкрепляющими свойствами, аналогичными таковым морфина; в связи с этим было высказано предположение о том, что эндогенные опиоиды, такие, как лей-энкефалин, участвуют в осуществлении функции подкрепления со «снижением мотиваций» [9]. О неизвестной пока еще роли эндорфинов в поддержании нормального поведения [12] свидетельствуют также данные об увеличении содержания эндорфинов в спинномозговой жидкости при хронических психозах [195], а также превосходный эффект наркотического антагониста налоксона при хронической шизофрении [58].

ПЕПТИДЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ СОН

Вполне возможно, что пептиды участвуют в механизмах, вызывающих сон. Это утверждение возвращает нас к 1910 г., когда Лежандр и Пьерон [110] сообщили об индукции сна у нормальных собак при внутрижелудочковой инъекции им спинноэмоговой жидкости (СМЖ) собак, лишенных сна. СМЖ нормальных животных такого действия не оказывала. Исследования в этой области развивались медленно, и, несмотря на некоторые отрицательные результаты, сейчас представляется очевидным, что и в тканях мозга, и в СМЖ фактор, индуцирующий сон, появляется в тот период, когда животное бывает лишено сна [36, 37, 137, 145, 146]. В отекающей же от мозга венозной крови кроликов он появляется во время сна, индуцированного электрической стимуляцией таламуса [131]. Фактор, обнаруженный в СМЖ и(или) в мозгу, обладает, очевидно, пептидной структурой [136, 145], а фактор, выделенный из крови, представляет собой нонапептид [178]. По-видимому, существует несколько индуцирующих сон пептидов различной молекулярной массы. В настоящее время неизвестно, существуют ли эти пептиды в преформированном состоянии, или же они образуются только по мере необходимости, т. е. при лишении сна.

ПЕПТИДЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОБУЧЕНИЕМ

Более 25 лет тому назад было высказано предположение о том, что основой долговременной памяти служит сохранение в мозгу специфически закодированных белков [89]. Позднее способность хранить информацию стали связывать с рибонуклеиновой кислотой [78, 79]. Принципиальным и спорным моментом в этой области является следующий вопрос: имеются ли в мозгу специфические информационные соединения и можно ли, экстрагируя эти соединения и вводя их необученным животным, передавать последним приобретенный навык? После удаления нуклеотидов и белков в экстрактах мозга обученных животных остаются пептиды, которые, согласно имеющимся данным, синтезируются в ходе обучения. Их биологическая активность заключается в индукции того типа поведения, которому обучалось животное-донор. Как указывал в своих обзорах Унгар [202, 203], появление специфических пептидов индуцируется при каждой из нижеперечисленных ситуаций обучения: избегание темноты (пептид: скотофобин), привыкание к шуму (пептид: амелетин), различение цвета у рыб, выработка плавательных реакций у рыб, избегание спрыгивания, прохождение лабиринта, избегание красного и зеленого, спинальная фиксация асимметричной позы. Скотофобин представляет собой пентадекапептид [204], амелетин — гексапептид [203], два фактора дискриминации цвета — додека- и тридекапептиды [190]. Не вдаваясь во все еще спорную область кодирования памяти пептидами [129], можно сослаться на следующее замечание Унгара [202]: «Молекулярный код попросту обозначает новые связи, созданные обучением, и гарантирует их сохранность в форме памяти». Пептиды могут также оказывать неспецифическое действие на обучение и процессы памяти, как это показано для АКТГ, вазопрессина, меланоцитстимулирующего гормона и β-липотропина.

ПРОЧИЕ ПЕПТИДЫ

Успешное развитие исследований нейрогормонов гипоталамуса и вещества Р стимулировало систематические поиски новых пептидов; особенно этому способствовало совершенствование методов экстрагирования и иммунологического тестирования. В результате были обнаружены ранее неизвестные тридекапептид нейротензин [21] и трипептид His-(Gly, Lys) из заднего столба спинного мозга кошки [117]. Этот трипептид оказывает тормозящее действие на нейроны задних рогов и ствола мозга, и по-видимому, имеет важное значение для торможения спинальных нейронов. Далее, во многих участках мозга иммунологическими методами были обнаружены гастрин [208], холецистокинин [35] и вазоактивный кишечный полипептид [17, 171]. Весьма неравномерное распределение этих пептидов в мозгу свидетельствует о том, что они выполняют какую-то пока еще неизвестную функциональную роль. Это относится также к дипептиду карнозину (Ala-His), локализованному преимущественно в обонятельной луковице. Исходя из такой его локализации и особенностей поведения в биохимических и физиологических экспериментах, Марголис [121] пришел к выводу, что карнозин является предполагаемым нейромедиатором в первичном обонятельном пути. Эта гипотеза нашла подтверждение в недавно обнаруженном синтезе карнозина в нейронах [138]. Однако является ли карнозин фармакологически активным пептидом? Анализ имеющейся литературы не дает четкого ответа на этот вопрос. Но, по нашим данным, карнозин усиливает сократительную реакцию электрически стимулированного vas deferens морской свинки [229]. Такой же эффект вызывают и некоторые другие пептиды: брадикинин, вещество P, эледоизин, ангиотензин и глюкагон, но при этом карнозин обладает наименее выраженным стимулирующим действием. Тем не менее даже такая слабая фармакологическая активность оказывается существенной и дает карнозину статус активного пептида, поскольку другие пептиды — тиролиберин, гастрин, нейротензин и соматостатин — не усиливают отмеченной сократительной реакции. Следовательно, для соответствующих нейронных структур карнозин может оказаться мощным агентом. Рассмотренный пример свидетельствует о следующем: 1) результаты нейрохимических исследований можно будет, очевидно, использовать для обнаружения скрытой фармакологической активности и 2) можно постулировать, что (предполагаемые) медиаторы (или модуляторы) могут обладать фармакологической активностью.

Новым гипотезам может угрожать опасность со стороны методических ловушек. Примером этому служит постулированная несколько лет назад ренин-ангиотензиновая система мозга [47, 52]. В настоящее время обсуждается вопрос о том, что и ренин, и ангиотензин II, обнаруживаемые в экстракте мозга, являются артефактами, обусловленными соответственно катепсином и ангиотензиназой, влияющими на результаты радиоиммунологического тестирования [31, 161]. Биотест на прессорное действие соответствующих экстрактов мозга также свидетельствует о неспецифической, а не ангиотензиноподобной активности [76]. Будет неудивительно, если окажется, что благодаря сходным ловушкам, обусловленным пептидазами мозга, при иммунологическом тестировании были получены кажущиеся данные о наличии других пептидов в экстрактах мозга. В такой ситуации задачу значительно облегчило бы использование специфического биотеста для каждого исследуемого пептида.

ПЕПТИДЫ С НЕИЗВЕСТНОЙ СТРУКТУРОЙ

Экстракты мозга содержат фармакологически активные компоненты, которые теряют свою активность при обработке пептидазами, что свидетельствует о существовании других нейропептидов с неизвестной структурой.

Неочищенный препарат вещества Р подавляет развитие судорог, вызываемых стрихнином и пикротоксином [186, 222, 223], причем противосудорожную активность можно отделить от вещества Р [14, 50, 90]. Неочищенный препарат вещества Р содержит помимо вещества Р фактор Fc, обладающий свойствами кислого, устойчивого к трипсину пептида [74, 90, 222, 224, 225]. В отличие от вещества Р фактор Fc содержится только в коре, но не в substantia nigra и бледном шаре [230]. Он стимулирует изолированную кишку путем высвобождения ацетилхолина [226], обладает лишь слабым гипотензивным действием и не увеличивает сократительного ответа электрически стимулированного vas deferens морской свинки [229]. Другие Fc-подобные факторы, которые, однако, инактивируются трипсином, были экстрагированы из подкорковых тканей, т. е. гипоталамуса, миндалевидного ядра и красного ядра [230]. Свойства этих факторов отчетливо указывают, что ни нейротензин, ни вазоактивный кишечный полипептид не служат активным началом этих соединений. Устойчивый к трипсину пептид выявляется также в высокоочищенном веществе Р из гипоталамуса козы [125]. Нельзя исключить, что в мозгу имеются и другие пептиды, подобные веществу Р [16, 81, 230].

Экстракты субклеточных частиц, полученных из нервных тканей, содержат материал, из которого под влиянием ферментов, таких, как трипсин, плазмин и калликреин, выделяется кининоподобный пептид, вызывающий сокращение кишки [42, 74, 75, 80, 180, 215, 216]. Кининоген и пептидазы, обеспечивающие высвобождение и инактивацию кининов, также обнаруживаются в мозгу [19, 216], но в свободном состоянии встречается лишь незначительное количество кининоподобного материала [215]. При повышении температуры у кроликов концентрация кининогена в гипоталамусе падает [150] и кининоподобные вещества обнаруживаются в перфузате желудочков мозга [20]. В связи с этим пришли к выводу, что кининоген-кининовая система мозга может участвовать в механизмах повышения температуры в ответ на пирогены [150]. При внутрижелудочковом введении брадикинин и каллидин оказывают возбуждающее действие и повышают кровяное давление [26]. Эти наблюдения представляют значительный интерес в связи с вызывающими сомнение данными о центральном действии брадикинина [211]. Однако, не зная точно химической структуры кинина (кининов), о котором идет речь, нельзя быть уверенным в том, что наблюдаемые эффекты не обусловлены нейротензином, классифицированным как кинин [21].

Пептидэргический нейрон.

КОНЦЕПЦИЯ И СТРУКТУРЫ

Термин «пептидэргический нейрон» был введен десять лет назад Баргманом и др. [6] и казался пригодным только для характеристики способа действия нейросекреторных нейронов гипоталамуса, синтезирующих окситоцин и вазопрессин. Места контакта этих нейронов с эпителиальными клетками получили название «пептидэргические синапсы». Однако через несколько лет, когда в экстрактах из различных участков мозга были обнаружены либерины гипоталамуса, вещество Р и другие активные пептиды, было постулировано, что пептидэргические нейроны широко распространены в нервной системе [227]. В результате дальнейшего прогресса в нейрофармакологии пептидов были получены данные, которые свидетельствовали о правомочности концепции пептидэргического нейрона [82, 228] и даже привели к представлению о гипоталамической пептидэргической сети, распространяющейся по всему мозгу [122]. Результаты, полученные сравнительно недавно с помощью иммуногистохимических методов, подтвердили внутринейронную локализацию вещества Р [67—70], мет-энкефалина и лей-энкефалина [40, 181], α- и β-эндорфинов [55], вазоактивного кишечного полипептида [108] и регуляторных факторов гипоталамуса — люлиберина и соматостатина [70, 92, 151]. И наконец, опыты с перерезкой нервных путей в головном мозгу выявили существование содержащих вещество Р путей в хабенуло-интерпедункулярном, стриато-нигральном и паллидо-нигральном трактах [41, 72, 73, 86, 134, 135]. Следовательно, в настоящее время имеется достаточное количество данных, подтверждающих существование пептидэргических нейронов в центральной и периферической нервной системе. Как и в случае холинэргических и моноаминэргических нейронов, интенсивное изучение пептидэргических нейронов началось с фармакологического анализа тканевых экстрактов и достигло кульминации в гистохимической локализации.

ПОСТУЛИРОВАННЫЕ ФУНКЦИИ НЕЙРОПЕПТИДОВ

В настоящее время по данному вопросу существуют только спекуляции, восходящие к началу пятидесятых годов, когда было обнаружено, что вещество Р распределено в мозгу неравномерно. В основе этих спекуляций лежат следующие данные: 1) работы Леви и Хеллауэра [116], а также Фельдберга и Фогта [46], показавшие, что содержание ацетилхолина и холинацетилазы в сенсорных нервах и мозжечке находится на очень низком уровне, 2) гипотеза Фельдберга и Фогта о чередовании холинэргических и нехолинэргических элементов в центральных трактах; 3) постулированное Фэттом [45] существование помимо ацетилхолина покрайней мере еще одного центрального вещества-медиатора. В связи со сказанным возникли представления о том, что вещество Р, возможно, является медиатором первого сенсорного нейрона [111], нехолинэргических [95, 232, 233] и тормозных [222] нейронов или же может функционировать как модулятор активности нейрона [99, 100, 102]. В настоящее время возможная роль вещества Р в передаче сенсорных импульсов все еще обсуждается [62, 94, 142, 144], но в целом преобладает точка зрения, что эти пептиды, по-видимому, участвуют в модуляции, а не в передаче нервных импульсов. Главным аргументом в пользу модуляторной функции являются данные о том, что действие пептидов на нейроны развивается медленнее и сохраняется дольше, чем соответствующие эффекты L-глутамата или ацетилхолина [63, 102, 103, 130, 154]. Модуляторное вещество может многими путями модифицировать функцию данного нейрона [48, 51, 99, 139, 185]. К возможным последствиям модуляторной функции, о которых нам уже известно, относятся усиливающее действие тиролиберина на обновление норадреналина в мозгу [91] подавление мет-энкефалином высвобождения норадреналина в мозгу крыс [191] и стимулирующее действие вещества Р на центральные моноаминэргические нейроны [119]. Кроме того, модуляторные эффекты могут лежать в основе действия пептидов на поведение [8] и предполагаемой роли вещества Р в контроле двигательных реакций и регуляции нейроэндокринных и вегетативных процессов [16]. Безусловно, модуляторное вещество должно найти свой специфический рецептор. В самом деле, обнаружена очень тесная связь между химической структурой и нейрологическими эффектами для дельта-фактора сна [178], меланостатина [11], вещества Р [142] и соматостатина [174].

Каждый пептидэргический нейрон должен иметь медиатор. Согласно гипотезе Дэйла [30] «один нейрон — один медиатор», это должен быть один данный пептид для одного данного нейрона. Однако если пептиды являются только модуляторами, то следует рассмотреть такую возможность, когда каждый пептидэргический нейрон помимо собственного модуляторного пептида имеет еще и свой типичный медиатор. Медиатор будет оказывать свое «on-off-»-действие синаптически, а модуляторная функция пептида будет осуществляться пресинаптически, как это установлено в случае вещества Р [184, 185], или постсинаптически, как предполагается в отношении некоторых либеринов гипоталамуса [162]. Фактически медиаторные функции в содержащих вещество Р нейронах хабенуло-интерпедункулярного тракта приписываются ацетилхолину [16, 134]. Одновременное существование больших и малых гранул в одном и том же содержащем вещество Р нейроне указывает на запасание по крайней мере еще одного вещества-медиатора помимо вещества Р [155]. Полагают, что нейросекреторные клетки супраоптического и паравентрикулярного ядер синтезируют помимо окситоцина и вазопрессина обычный медиатор, используемый для возвратного моносинаптического торможения [8]. В связи с модуляторными пептидами возникает также вопрос: может ли один нейрон высвобождать более одного медиатора [18]? В настоящее время известно, что вещество Р и соматостатин локализованы в различных субпопуляциях первичных сенсорных нейронов [67]. Это в равной степени относится и к локализации люлиберина и соматостатина в различных нейронах гипоталамуса [151].

Строго говоря, термин «нейропептид» нельзя использовать применительно к веществу Р, соматостатину, гастрину, холецистокинину, вазоактивному полипептиду кишечника и энкефалинам, которые являются общими для мозга и кишечника. Последнее лежит в основе постулата Пирса [149], согласно которому все клетки, продуцирующие эти пептиды, происходят из одной и той же специализированной эктодермы. Следовательно, только окситоцин, вазопрессин и либерины заслуживают статуса нейропептидов в строгом смысле этого понятия. Более того, остается нерешенным вопрос, существуют ли специфические для мозга пептиды, которые синтезируются исключительно нервными клетками и функционируют исключительно в головном и спинном мозгу.

Специальные проблемы

МОЗЖЕЧОК

В мозжечке обнаружено очень низкое содержание специфических фармакологически активных веществ, присутствующих в других отделах мозга [124]. Исходя из этого, Кросслэнд и Митчел [28] высказали предположение, что «мозжечок может служить относительно богатым источником по крайней мере одного вещества-медиатора, отличного от ацетилхолина». Поиски специфического вещества-медиатора привели к тому, что был обнаружен возбуждающий фактор мозжечка, идентифицированный как эрготионеин [29], который имеется при этом и в других участках мозга, характеризующихся нехолинэргическими свойствами. Другим предполагаемым веществом-медиатором в мозжечке является глутаминовая кислота [49, 221].

В связи со сказанным заслуживает внимания тот факт, что в мозжечке содержание активных пептидов также очень низко. В отношении вещества Р это впервые было показано более 20 лет назад [2, 95, 232, 233], а недавно такие же данные получили еще две группы исследователей [16, 87], однако третья группа не подтвердила этих результатов [39]. Очень низко в мозжечке и содержание следующих пептидов: тиролиберина [219], соматостатина [148, 206], нейротензина [22], гастриноподобного иммунореактивного фактора [208], вазоактивного кишечного полипептида [17, 171], ангиотензина [47] и энкефалинов [181, 220]. Количество опиатных рецепторов в мозжечке также низко [4, 107]. Эти данные можно было бы расценивать как свидетельство небольшого значения пептидэргических механизмов в мозжечке. Однако мы не будем делать такого вывода, а сошлемся на предположение о том, что расхождение между низким содержанием ацетилхолина и низкой активностью холинацетилазы в этом участке мозга, с одной стороны, и высокой активностью ацетилхолинэстеразы, с другой стороны, может указывать на более сильную или более строго регулируемую медиаторную функцию ацетилхолина в структурах мозжечка [32].

СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ

25 лет назад Коллин [25] рассмотрел спинномозговую жидкость (СМЖ) как средство транспорта нейрогипофизарных гормонов, и этот механизм совместно с механизмом нейросекреции в СМЖ получил название «гидроцефалокринный». В самом деле, почти все нейропептиды обнаруживаются в СМЖ: окситоцин и вазопрессин [61, 167, 210], тиролиберин, соматолиберин и люлиберин [93, 160], соматостатин [148], вещество Р [141], фактор, вызывающий сон [36, 37, 137, 146], вазоактивный полипептид кишечника [44], кинин [20] и эндорфины [195]. Имеется все еще некоторая неопределенность относительно пути их попадания в СМЖ [118]. Однако следует учесть, что СМЖ свободно сообщается с внеклеточной жидкостью мозга [10] и, кроме того, существует структурная связь между тканями мозга и системой желудочков [114, 166, 209]. Не удивительно, что высказываются предположения о значении СМЖ как интегрирующего тракта для нейрогуморальных веществ [93, 118, 167, 168]. Представляется возможным, что высвобождающиеся в СМЖ нейропептиды могут достигать отдаленных участков мозга, расположенных вблизи системы желудочков, и оказывать там свое действие. В равной мере это может относиться и к инъецируемым в желудочек пептидам, как это, в частности, принято считать в отношении поведенчески активных пептидов [33].

В СМЖ больных, страдающих хроническими психозами, концентрация эндорфинов повышается [195]. Концентрация соматостатина у больных с заболеваниями головного или спинного мозга оказывается выше, чем самый высокий уровень содержания соматостатина в СМЖ в норме [148], а концентрация вазоактивного полипептида кишечника аномально низка при церебральной атрофии [44]. Следовательно, вполне возможно, что в будущем система тестов для определения нейропептидов в СМЖ будет иметь диагностическое значение.

Заключение

В истории исследований фармакологически активных нейропептидов можно выявить три тенденции. Во-первых, число обнаруженных пептидов и данные об их локализации в мозгу постоянно расширяются, и можно предсказать существование богатой пептидной хемоархитектуры, пронизывающей всю нервную систему. Во-вторых, на смену представлению «один пептид — одна функция» пришло предположение, что данный пептид может обладать более чем одной функцией. Подтверждением этому служит пример либеринов или окситоцина и вазопрессина, функции которых реализуются как в самом мозгу, так и вне его. И в-третьих, хотя физиологическая роль нейропептидов пока еще не установлена, существует широко распространенное мнение, что пептиды эти действуют, возможно, не путем простой синаптической передачи импульсов, а способны модулировать нейронные функции, что приводит к специфическим изменениям поведения.

История перспектив в области изучения нейропептидов может быть завершена недавно сформулированным предсказанием Гуиллемина [55]: «Если учесть, что нынешние концепции нейрофизиологии, нейрологии и нейропсихиатрии сложились без учета этих данных, то можно думать, что будущее развитие этой области исследования окажется революционизирующим».

* *
*

Автор выражает признательность миссис Кучке за техническую помощь.

Список литературы

1. *Abel J. J.* Bull. Johns Hopk. Hosp., **35**, 305—328 (1924).
2. *Amin A. H., Crawford T. B. B., Gaddum J. H.* J. Physiol. (Lond.), **126**, 596—618 (1954).
3. *Angelucci L.* Brit. J. Pharmacol., **11**, 161—170 (1956).
4. *Atweh S. F., Kuhar M. J.* Brain Res., **124**, 53—68 (1977).
5. *Bargmann W.* Z., Zellforsch.. **34**, 610—634 (1949).
6. *Bargmann W., Lindner E., Andres K. H.* Z. Zellforsch., **77**, 282—298 (1967).
7. *Bargmann W., Scharrer E.* Amer. Scientist, **39**, 255—259 (1951).
8. *Barker J. L.* Physiol. Rev., **56**, 435—452 (1976).
9. *Belluzzi J. D., Stein L.* Nature (Lond.), **266**, 556—558 (1977).
10. *Bering E. A.* Fed. Proc., **33**, 2061—2063 (1974).
11. *Björkman S., Castensson S., Lindeke B.* Acta pharm. Suecia, **13**, 289—298 (1976).
12. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
13. *Bogoch S.* In: Handbook of Neurochemistry, Vol. 1, ed. A. Lajtha, pp. 75—92, Plenum Press, New York (1969).
14. *Bonta I. L., Wijmenga H. G., Hohensee F.* Acta physiol. pharmacol. neerl., **10**, 114—118 (1961).
15. *Brownstein M. J., Arimura A., Fernandezdurago R., Schally A. V., Palkovits M., Kizer J. S.* Endocrinology, **100**, 246—249 (1977).

16. *Brownstein M. J., Mroz E. A., Kizer J. S., Palkovits M., Leeman S. E.* Brain Res., **116**, 299—305 (1976).
17. *Bryant M. G., Polak J. M., Modlin I., Bloom S. R., Albuquerque R. H., Pearse A. G. E.* Lancet I, 991—993 (1976).
18. *Burnstock G.* Neuroscience, **1**, 239—248 (1976).
19. *Camargo A. C. M., Ramalho-Pinto B. J., Greene L. Y.* J. Neurochem., **19**, 37—49 (1972).
20. *Campanha V. P., Rocha e Silva M.* Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas, **10**, 70 (1977).
21. *Carraway R., Leeman S. E.* J. biol. Chem., **248**, 6854—6861 (1973).
22. *Carraway R., Leeman S. E.* J. biol. Chem., **251**, 7045—7052 (1976).
23. *Chang M. M., Leeman S. E., Niall H. D.* Nature (Lond.), **232**, 86—87 (1971).
24. *Collin R.* Arch. Morphol., **28**, 1—102 (1928).
25. *Collin R.* Bull. Ass. Anat. (Nancy), **59**, 57—92 (1951).
26. *Corrêa F. M. A., Graeff F. G.* Neuropharmacology, **13**, 65—75 (1974).
27. *Cox B., Kastin A. J., Schnieden H.* Europ. J. Pharmacol., **36**, 141—147 (1976).
28. *Crossland J., Mitchell J. F.* J. Physiol. (Lond.), **132**, 391—405 (1956).
29. *Crossland J., Mitchell J. F., Woodruff G. N.* J. Physiol. (Lond.), **182**, 427—438 (1966).
30. *Dale H. H.* Proc. roy. Soc. Med., **28**, 319—332 (1935).
31. *Day R. P., Reid I. A.* Endocrinology, **99**, 93—100 (1976).
32. *De Feudis F. V.* Central cholinergic systems and behaviour, Academic Press, London — New York — San Francisco (1974).
33. *De Wied D.* Life Sci., **20**, 195—204 (1977).
34. *De Wied D., De Jong W.* Ann. Rev. Pharmacol., **14**, 389—412 (1974).
35. *Dockray G. J.* Nature (Lond.), **264**, 568—569 (1976).
36. *Drucker-Colin R. R.* Brain Res., **56**, 123—134 (1973).
37. *Drucker-Colin R. R., Rojas-Ramirez J., Vera-Trueba J., Monroy-Ayala G., Hernández-Peón R.* Brain Res., **23**, 269—273 (1970).
38. *Duffy M. J., Mulhall D., Powoll D.*, J. Neurochem., **25**, 305—308 (1975).
39. *Duffy M. J., Wong J., Powell D.* Neuropharmacology, **14**, 615—618 (1975).
40. *Elde R., Hökfelt T., Johannson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
41. *Emson P. C., Kanazawa I., Cuello A. C., Jessel T. M.* Biochem. Soc. Transactions, **5**, 187—188 (1977).
42. *Euler U. S. von.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **104**, 449—463 (1963).
43. *Euler U. S. von, Gaddum J. H.* J. Physiol. (Lond.), **72**, 74—87 (1931).
44. *Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O. B., Fahrenkrug A.* Brain Res., **124**, 581—584 (1977).
45. *Fatt P.* Physiol. Rev., **34**, 674—710 (1954).
46. *Feldberg W., Vogt M.* J. Physiol. (Lond.), **107**, 372—381 (1948).
47. *Fischer-Ferraro C., Nahmod V. E., Goldstein D. J., Finkielman S.* J. exp. Med., **133**, 353—361 (1971).
48. *Florey E.* Fed. Proc., **26**. 1164—1178 (1967).
49. *Foster A. C., Roberts P. J.* Brit. J. Pharmacol., **60**, 273 p. (1977).
50. *Gaddum J. H., Randić M., Smith M. W.*, J. Physiol. (Lond.), **172**, 207—215 (1964).
51. *Gainer H.* Advanc. Biochem. Psychopharmacol., **15**, 193—210 (1976).
52. *Ganten D., Marquez-Julio A., Granger P., Hayduk K., Karsunky K. P., Boucher R., Genest J.*, Amer. J. Physiol., **221**, 1733—1737 (1971).
53. *Goldstein A.* Science, **193**, 1081—1085 (1976).
54. *Grabneer K., Lembeck F.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **240**, 157—161 (1960).
55. *Guillemin R.* New Engl. J. Med., **296**, 226—228 (1977).
56. *Guillemin R., Ling N. Burgus R., Bloom F., Segal D.* Psychoneuroendocrinology, **2**, 59—62 (1977).
57. *Guillemin R., Rosenberg B.* Endocrinology, **57**, 599—607 (1955).
58. *Gunne L.-M., Lindström L., Terenius L.* J. Neural Transmission, **39** (1976). In press.

59. *Haefely W., Hürlimann A.* Experientia (Basel), **18**, 297—303 (1962).
60. *Harris G. W.* In: Handbook of Physiology, Section 1, Neurophysiology, Vol. II, ed. Magoun H. W., pp. 1007—1038, American Physiological Society, Washington (1960).
61. *Heller H., Hasan S. H., Saifi A. W.* J. Endocr., **41**. 273—280 (1968).
62. *Henry J. L.* Brain Res., **114**, 439—452 (1976).
63. *Henry J. L., Krnjević K., Morris M. E.* Canad. J. Physiol. Pharmacol., **53**, 423—432 (1975).
64. *Hild W., Zetler G.* Experientia (Basel), **7**, 189 (1951).
65. *Hild W., Zetler G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **213**, 139—153 (1951).
66. *Hild W., Zetler G.* Pflügers Arch. ges. Physiol., **257**, 169—201 (1953).
67. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Luft R., Nilsson G., Arimura A.* Neuroscience, **1**, 131—136 (1976).
68. *Hökfelt T., Kellerth J.-O., Nilsson G., Pernow B.* Science, **190**, 889—890 (1975).
69. *Hökfelt T., Kellerth J.-O., Nilsson G., Pernow B.*, Brain Res., **100**, 235—252 (1975).
70. *Hökfelt T., Meyerson B., Nilsson G., Pernow B., Sachs C.* Brain Res., **104**, 181—186 (1976).
71. *Holton P.* J. Physiol. (Lond.), **149**, 35 P—36 P (1959).
72. *Hong J. S., Costa E., Yang H. Y. T.* Brains Res., **118**, 523—525 (1976).
73. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Racagni G., Costa E.* Brain Res., **122**, 541—544 (1977).
74. *Hori S.* Jap. J. Physiol., **18**, 746—771 (1968).
75. *Hori S.* Jap. J. Physiol., **18**, 772—787 (1968).
76. *Horvath J., Baxter C., Furby F., Tiller D.* Clin. Res., **24**, 223 A (1976).
77. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
78. *Hydén H.* In: Biochemistry of the Central Nervous System, Vol. 3, Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., ed. F. Brücke, pp. 64—89, Pergamon Press, London (1959).
79. *Hydén H.. Egyházi E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **48**, 1366—1373 (1962).
80. *Inouye A., Kataoka K., Tsujioka T.* Jap. J. Physiol., **11**, 319—334 (1961).
81. *Iven H., Zetler G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **276**, 123—131 (1973).
82. *Iversen L. L.* Nature (Lond.), **252**, 630 (1974).
83. *Jacquet Y. F., Marks N.* Science, **194**, 632—634 (1976).
84. *Jessell T. M.* Brit. J. Pharmacol., **59**, 486 P (1977).
85. *Jessell T., Iversen L. L., Kanazawa I.* Nature (Lond.), **264**, 81—83 (1976).
86. *Kanazawa I., Emson P. C., Cuello A. C.* Brain Res., **119**, 447—453 (1977).
87. *Kanazawa I., Jessell T.* Brain Res., **117**, 362—367 (1976).
88. *Kastin A. J., Scollan E. L., King M. G., Schally A. V., Coy D. H.* Pharmacol. Biochem. Behav., **5**, 691—696 (1976).
89. *Katz M. S., Halstead W. C.* Comp. Psychol. Monogr., **20** (1), 1—38 (1950).
90. *Kawaguchi S., Imaizumi M., Shio H., Kataoka K.*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path., **260**, 284—297 (1968).
91. *Keller H. H., Bartholini G., Pletscher A.* Nature (Lond.), **248**, 528—529 (1974).
92. *King J. C., Gerall A. A.* J. Histochem. Cytochem., **24**, 829—845 (1976).
93. *Knigge K. M., Joseph S. A.* Acta endocr. (Kbh.), **76**, 209—213 (1974).
94. *Konishi S., Otsuka M.* Brain Res., **65**, 397—410 (1974).
95. *Kopera H., Lazarini W.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **219**, 214—222 (1953).
96. *Kraemer G. W., Mueller R., Breese G. R., Prange A. J., Lewis J. K., Morrison N., McKinney W. T.* Pharmacol. Biochem., Behav., **4**, 709—712 (1976).
97. *Krivoy W. A., Kroeger D., Taylor A. N., Zimmermann E.* Europ. J. Pharmacol., **27**, 339—345 (1974).
98. *Krivoy W. A., Kroeger D. C., Zimmermann E.*, Psychoneuroendocrinology, **2**, 43—52 (1977).

99. *Krivoy W., Kroeger D. C., Zimmermann E.* In: Substance P, ed. U. von Euler and B. Pernow, pp. 187—193, Raven Press, New York (1977).
100. *Krivoy W., Lane M., Kroeger D.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **104**, 312—329 (1963).
101. *Krivoy W. A., Zimmermann E., Lande S.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **71**, 1852—1856 (1974).
102. *Krnjevic K.* In: Substance P, eds. U. S. von Euler and B. Pernow, pp. 217—230, Raven Press, New York (1977).
103. *Krnjević K., Morris M. E.* Canad. J. Physiol. Pharmacol., **52**, 736—744 (1974).
104. *Kruse H.* J. Pharmacol. (Paris), **6**, 249—268 (1975).
105. *Kruse H.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **294**, 39—45 (1976).
106. *Kubek M. J., Lorincz M. A., Wilber J. F.* Brain Res., **126**, 196—200 (1977).
107. *Kuhar M. M., Pert C. B., Snyder S. H.* Nature (Lond.), **245**, 447—450 (1973).
108. *Larsson L.-I., Fahrenkrug J., Schaffalitsky de Muckadell O., Sundler F., Håkanson R., Rehfeld J. F.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **73**, 3197—3200 (1976).
109. *Leeman S. E., Mroz E. A.* Life Sci., **15**, 2033—2044 (1974).
110. *Legendre R., Piéron H.* C. R. Soc. Biol. (Paris), **68**, 1108—1109 (1910).
111. *Lembeck F.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **219**, 197—213 (1953).
112. *Lembeck F., Zetler G.* Int. Rev. Neurobiol., **4**, 159—215 (1962).
113. *Lembeck F., Zetler G.* In: Pharmacology of Naturally Occurring Polypeptides and Lipid-soluble Acids, ed. J. M. Walker. Internatl. Encycl. Pharmacol. and Ther., Sect. 72, Vol. 1, pp. 29—71, Pergamon Press, Oxford (1971).
114. *Leonhardt H.* In: Aspects of Neuroendocrinology, eds. W. Bargmann and B. Scharrer, pp. 338—348, Springer Verlag, New York (1970).
115. *Ling N., Burgus R., Guillemin R.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **73**, 3942—3946 (1976).
116. *Loewi O., Hellauer H.* Pflügers Arch. ges. Physiol., **240**, 769—775 (1938).
117. *Lote C. J., Gent J. P., Wolstencroft J. H., Szelke M.* Nature (Lond.), **264**, 188—189 (1976).
118. *MacLeod R. M., Login I. S.* Advanc. Biochem. Psychopharmacol., **16**, 147—157 (1977).
119. *Magnusson T., Carlsson A., Fischer G. H., Chang D., Folkers K.* J. Neural. Transm., **38**, 89—94 (1976).
120. *Malick J. B., Goldstein J. M.* Fed. Proc., **36**, 994 (1977).
121. *Margolis F. L.* Advanc. Neurochem., **1**, 193—246 (1975).
122. *Martin J. B., Renaud L. P., Brazeau P.* Lancet II, 393—395 (1975).
123. *Mayer D. J., Price D. D., Rafii A.* Brain Res., **121**, 368—372 (1977).
124. *McLennan H.* Synaptic Transmission, W. B. Saunders Company, Philadelphia — London (1963).
125. *Meinardi H., Craig L. C.* In: Hypotensive Peptides, eds. E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri, pp. 594—607, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York (1966).
126. *Melvillee E. V., Hare K.* Endocrinology, **36**, 323—329 (1945).
127. *Metcalf G., Myers R. D.* Brit. J. Pharmacol., 58, 489—495 (1976).
128. *Meyerson B. J., Terenius L.* Europ. J. Pharmacol., **42**, 191—192 (1977).
129. *Miller R. R., Small D., Berk A. M.* Behav. Biol., **15**, 463—472 (1975).
130. *Monnier M., Dudler L., Gachter R., Maier P. F., Tobler H. J., Schoenenberger G. A.*, Experientia (Basel), **33**, 548—551 (1977).
131. *Monnier M., Hösli L.* Science, **146**, 796—798 (1964).
132. *Mora S., Loizzo A., Longo V. G.* Pharmacol. Biochem. Behav., **4**, 279—282 (1976).
133. *Moss R. L., Dyball R. E. J., Cross B. A.* Exp. Neurol., **34**, 95—102 (1972).
134. *Mroz E. A., Brownstein M. J., Leeman S. E.* Brain Res., **83**, 597—599 (1976).
135. *Mroz E. A., Brownstein M. J., Leeman S. E.* Brain Res., **125**, 305—312 (1977).
136. *Nagasaki H.* Personal communication (to be published) (1977).
137. *Nagasaki H., Iriki M., Inoue S., Uchizono K.* Proc. Jap. Acad., **50**, 241—246 (1974).

138. *Ng R. H., Marshall F. D., Henn F. A., Sellström A.* J. Neurochem., **28**, 449—452 (1977).

139. *Nicoll R. A.* In: Handbook of Psychopharmacology, Vol. 4, eds. L. L. Iversen, S. D. Iversen and S. H. Snyder, pp. 229—263, Plenum Press, New York and London (1975).

140. *Nicoll R. A., Barker J. L.* Brain Res., **35**, 501—511 (1971).

141. *Nilsson G., Pernow B., Fisher G. H., Folkers K.* In: Substance P, eds. U. S. von Euler and B. Pernow, pp. 41—48, Raven Press, New York (1977).

142. *Otsuka M.* In: Neurotransmission, Proc. Sixth Int. Congr. Pharmacol., Vol. 2, ed. L. Antee, pp. 39—47, Pergamon Press, Oxford (1976).

143. *Otsuka M., Konishi S.* Nature (Lond.), **264**, 83—84 (1976).

144. *Otsuka M., Takahashi T.* Ann. Rev. Pharmacol., **17**, 425—439 (1977).

145. *Pappenheimer J. R., Koski G., Fencl V., Karnovsky M. L., Krueger J.* J. Neurophysiol., **38**, 1299—1311 (1975).

146. *Pappenheimer J. R., Miller T. B., Goodrich C. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **58**, 513—517 (1967).

147. *Pasternak G., Goodman R., Snyder S. H.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).

148. *Patel Y. C., Rao K., Reichlin S.*, New Engl. J., **296**, 529—533 (1977).

149. *Pearse A. G. E.* Nature (Lond.), **262**, 92—94 (1976).

150. *Pela I. R., Gardey-Levassort C., Lechat P., Rocha e Silva M.* J. Pharm. Pharmacol., **27**, 793—794 (1975).

151. *Pelletier G., Leclerc R., Dubé D.* J. Histochem. Cytochem., **24**, 864—871 (1976).

152. *Pernow B.* Acta physiol. scand., 29, Suppl. **105**, 1—90 (1953).

153. *Pert A., Sivit C.* Nature (Lond.), **265**, 645—647 (1977).

154. *Phillis J. W., Limacher J. J.* Brain Res., **69**, 158—163 (1974).

155. *Pickel V. M., Reis D., Leeman S. E.* Brain Res., **122**, 534—540 (1977).

156. *Plotnikoff N. P., Kastin A. J.* Biochem. Pharmacol., **25**, 363—365 (1976).

157. *Powell D., Leeman S., Tregear G. W., Niall H. D., Potts J. T.* Nature (Lond.), **241**, 252—253 (1973).

158. *Ramwell P. W., Shaw J. E., Jessup R.* Amer. J. Physiol., **211**, 993—1004 (1966).

159. *Reichelt K. L., Edminson P. D.* Advanc. Biochem. Psychopharmacol., **15**, 211—223 (1976).

160. *Reichlin S., Saperstein R., Jackson I. M. D., Boyd A. E., Patel Y.* Ann. Rev. Physiol., **38**, 389—424 (1976).

161. *Reid I. A., Day R. P., Moffat B., Hughes H. G.* J. Neurochem., **28**, 435—438 (1977).

162. *Renaud L. P., Martin J. B., Brazeau P.* Pharmacol. Biochem. Behav., **5**, Suppl. 1, 171—178 (1976).

163. *Rezek M., Havlicek V., Hughes K. R., Friesen H.* Neuropharmacology, **16**, 157—162 (1977).

164. *Ringle D. A., Herndon B. L.* Pflügers Arch. Europ. J. Physiol., **303**, 344—349 (1968).

165. *Ringle D. A., Herndon B. L.* Pflügers Arch. Europ. J. Physiol., **306**, 320—328 (1969).

166. *Rodriguez E. M.* In: Aspects of Neuroendocrinology, eds. W. Bargmann and B. Scharrer, pp. 352—365 (1970), Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.

167. *Rodriguez E. M.* J. Endocrinology, **71**, 407—443 (1976).

168. *Rudman D., Scott J. W., Del Rio A. E., Houser D. H., Sheen S.* Amer. J. Physiol., **226**, 682—686 (1974).

169. *Saffran M.* In: Handbook of Physiology, Sect. 7, Endocrinology, Vol. IV, Part 2, eds. E. Knobil and W. H. Sawyer, pp. 563—586, American Physiological Society, Washington (1974).

170. *Saffran M., Schally A. V., Benfey B. G.* Endocrinology, **57**, 439—444 (1955).

171. *Said S. I., Rosenberg R. N.* Science, **192**, 907—908 (1976).

172. *Sandman C. A., Miller L. H., Kastin A. J.* Pharmacol. Biochem. Behav., **5**, Suppl. 1, 1—192 (1976).

173. *Sano I.* Int. Rev. Neurobiol., **12**, 235—263 (1970).

174. *Sarantakis D., Teichman J.. Clark D. E., Lien E. L.* Biochem. biophys. Res. Commun., 75, 143—148 (1977).
175. *Sato G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **131**, 45—69 (1928).
176. *Scharrer E.* Z. Anat., **106**, 169—192 (1936).
177. *Schenker C., Mroz E. A., Leeman S. E.* Nature (Lond.), **264**, 790—791 (1976).
178. *Schoenenberger G. A., Monnier M.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **74**, 1282—1286 (1977).
179. *Shaw J. E., Ramwell P. W.* Amer. J. Physiol., **215**, 261—267 (1968).
180. *Shikimi T., Kema R., Matsumoto M., Yamahata Y., Miyata S.* Biochem. Pharmacol., 22, 567—573 (1973).
181. *Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder S. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **74**, 2167—2171 (1977).
182. *Simon E. J.* Neurochem. Res., **1**, 3—28 (1976).
183. *Snyder S. H., Simantov R.* J. Neurochem., 28, 13—20 (1977).
184. *Steinacker A.* Nature (Lond.), **267**, 268—269 (1977).
185. *Steinacker A., Highstein S. M.* Brain Res., **114**, 128—133 (1976).
186. *Stern P., Hukovic S.* Med. exp. (Basel), **2**, 1—7 (1960).
187. *Stewart J. M., Getto C. J., Neldner K., Reeve E. B., Krivoy W. A., Zimmermann E.* Nature (Lond.), **262**, 784—785 (1976).
188. *Takahashi T., Konishi S., Powell D., Leeman S. E., Otsuka M.* Brain Res., **73**, 59—69 (1974).
189. *Takahashi T.. Otsuka M.* Brain. Res., **87**, 1—11 (1975).
190. *Tate D. F., Galvan L., Ungar G.* Pharmacol. Biochem. Behav., **5**, 441—448 (1976).
191. *Taube H. D., Borowski E., Endo T., Starke K.* Europ., J. Pharmacol., **38**, 377—380 (1976).
192. *Terenius L.* J. Pharm. Pharmacol., **27**, 450—451 (1975).
193. *Terenius L.* Europ. J. Pharmacol., **38**, 211—213 (1976).
194. *Terenius L., Wahlström A.* Acta pharmacol. (Kbh.), **35**, Suppl. 1, 55 (1974).
195. *Terenius L., Wahlström A., Lindström L., Widerlöv E.* Neuroscience Letters, **3**, 157—162 (1976).
196. *Teschemacher H., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1771—1776 (1975).
197. *Traczyk W. Z.* Bull. Acad. pol. Sci. (Biol.), **22**, 731—735 (1974).
198. *Traczyk W. Z.* In: Substance P, eds. U. S. von Euler and B. Pernow, pp. 155—168, Raven Press, New York (1977).
199. *Chang M. M.* Nature (Lond.), **232**, 87—88 (1971).
200. *Trendelenburg P.* Klin. Wschr., **7**, 1679—1680 (1928).
201. *Turner R. A., Pierce J. G., Du Vigneaud V.* J. biol. Chem., **191**, 21—28 (1951).
202. *Ungar G.* Biochem. Pharmacol., **23**, 1553—1558 (1974).
203. *Ungar G.* Life Sci., **14**, 595—604 (1974).
204. *Ungar G., Desidero D., Parr W.* Nature (Lond.), **238**, 198—202 (1972).
205. *Ungar G., Ungar A. L., Malin D. H., Sarantakis D.* Psychoneuroendocrinology, **2**, 1—10 (1977).
206. *Vale W., Brazeau P., Rivier C., Brown M., Boss B., Rivier J., Burgus R., Ling N., Guillemin R.* Recent Progr. Hormone Res., **31**, 365—397 (1975).
207. *Vale W., Rivier C., Brown M.* Ann. Rev. Physiol., **39**, 473—528 (1977).
208. *Vanderhaeghen J. J., Signeau J. C., Gepts W.* Nature (Lond.), **257**, 604—605 (1975).
209. *Vigh-Teichmann I., Vigh B.* In: Aspects of Neuroendocrinology, eds. W. Bargmann and B. Scharrer, pp. 329—337, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York (1970).
210. *Vorherr H., Bradbury M. W. B., Hoghoughi M., Kleeman C. R.* Endocrinology, **83**, 246—250 (1968).
211. *Walaszek E. J.* In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol. 25, Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, eds. E. G. Erdös and A. F. Wilde, pp. 430—433, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York (1970).

212. *Walker J. M., Berntson G. G., Sandman C. A., Coy D. H., Schally A. V., Kastin A. J.* Science, **196**, 85—86 (1977).
213. *Walter R.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **248**, 5—512 (1975).
214. *Wei E., Loh H., Way E. L.* Europ. J. Pharmacol., **36**, 227—229 (1976).
215. *Werle E., Vogel R.* Arch. int. Pharmacodyn., **131**, 257—261 (1961).
216. *Werle E., Zach P.* Z. klin. Chem. klin. Biochem., **8**, 186—189 (1970).
217. *Wiegant V. M., Gipsen W. H., Terenius L., De Wied D.* Psychoneuroendocrinology, 2, 63—70 (1977).
218. *Wilber J. F., Montoya E., Plotnikoff N. P., White W. F., Gendrich R., Renaud L., Martin J. B.* Recent Progr. Hormone Res., **32**, 117—159 (1976).
219. *Winokur A., Utiger R. D.* Science, **185**, 265—267 (1974).
220. *Yang H.-Y., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).
221. *Young A. B., Oster-Granite M. L., Herndon R. M., Snyder S. H.* Brain Res., 73, 1—13 (1974).
222. *Zetler G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **228**, 513—538 (1956).
223. *Zetler G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **237**, 11—16 (1959).
224. *Zetler G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharmak., **242**, 330—352 (1961).
225. *Zetler G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **246**, 504—516 (1964).
226. *Zetler G.* In: Hypotensive Peptides. eds. E. G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri, pp. 621—630, Springer Verlag, New York (1966).
227. *Zetler G.* In: Aspects of Neuroendocrinology, eds. W. Bargmann and B. Scharrer, pp. 287—295, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York (1970).
228. *Zetler G.* Biochem. Pharmacol., **25**, 1817—1818 (1976).
229. *Zetler G.* In: Substance P, eds. U. S. von Euler and B. Pernow, pp. 97—115, Raven Press, New York (1977).
230. *Zetler G., Hümpel J.-E., Iven H.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak., **270**, 65—78 (1971).
231. *Zetler G., Schaffii-Laschteneschai A.-H., Jacobsen F. G.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **246**, 191—202 (1963).
232. *Zetler G., Schlosser L.* Pflügers Arch. ges. Physiol., **259**, 303—305 (1954).
233. *Zetler G., Schlosser L.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., **224**, 159—175 (1955).

ХИМИЯ РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОПЕПТИДАМИ

Р. ГАЙГЕР

(R. Geiger)

Основы гормональной регуляции известны, однако многие детали в этом вопросе изучены еще плохо. К ним, в частности, относятся следующие вопросы:

1. Транскрипция ДНК с образованием в конечном счете структур, являющихся предшественниками пептидных гормонов.
2. Возникновение гормонов после специфического ферментативного гидролиза пептидных связей.
3. Экзоцитоз и его модуляция такими соединениями, как соматостатин.
4. Транспорт.
5. Реакция с рецепторами мишени.
6. Ферментативная инактивация и полная деградация.

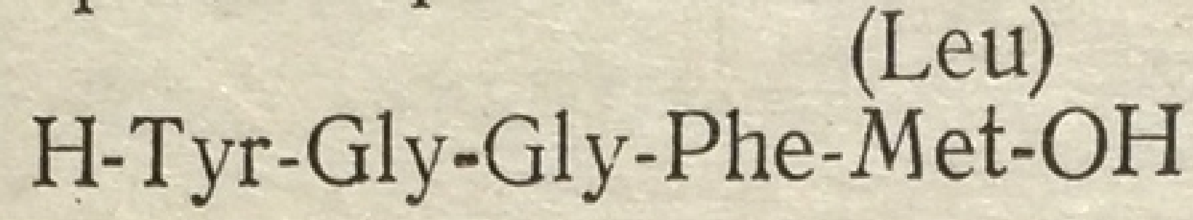
В течение последних нескольких лет было обнаружено все более увеличивающееся количество гландулярных, или местных, гормонов, оказывающих влияние на активность ЦНС. Иммунореактивный α-меланоцитстимулирующий гормон (α-МСГ) выделен из всех участков мозга [10]. Это свидетельствует о его активности в качестве нейромедиатора; такая же роль приписывается синтезируемым в гипоталамусе нейротензину и веществу Р.

Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH
Нейротензин

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2
Вещество Р

Обнаружение этих и других пептидов в мозгу и ткани кишечника ставит вопрос об эмбриональной взаимосвязи клеток, продуцирующих пептидные гормоны и распределенных между различными органами во взрослых организмах. Выдвинутая Пирсом [11] концепция клеток APUD (от англ. Amine Precursor Uptake and Decarbokylation cells — клетки, захватывающие и декарбоксилирующие предшественники аминов) соответствует этому представлению. Оно подтверждается также тесным структурным соответствием частичных последовательностей многих пептидных гормонов, несмотря даже на совершенно различные биологические функции этих гормонов. Клетки APUD рассматриваются как нервные клетки, происходящие из специализированной эктодермы.

Поиски аналогий пептидным гормонам получили бурное развитие в результате открытия пептидов, являющихся природными лигандами опиатных рецепторов мозга.



$$\text{H-Tyr-Gly-Gly-Phe-}\overset{\text{(Leu)}}{\text{Met}}\text{-OH}$$

Энкефалин

По аминокислотной последовательности пентапептид энкефалин оказался идентичным фрагменту 61—65 гипофизарного гормона β-липотропина (рис. 1). Позднее было обнаружено, что С-концевой фрагмент 61—91, получивший название «β-эндорфин», является наиболее активным представителем этого семейства пептидов, образованных из этой последовательности [3].

β-Липотропин содержит также аминокислотную последовательность β-МСГ. Следовательно, одной из функций липотропина является функция прогормона или промедиатора, по крайней мере для β-МСГ и эндорфинов. Роль его как предшественника энкефалинов в настоящее время неясна. Сложность заключается в вопросе о предшественнике природного 5-лей-энкефалина, поскольку до настоящего времени не обнаружен липотропин с остатком лейцина в соответствующем положении 65.

β-МСГ отделен от β-эндорфина в молекуле β-липотропина только двумя основными аминокислотами — лизином и аргинином — в положениях 59 и 60. Такой дипептид часто обнаруживают на конце аминокислотных последовательностей, выделяющихся при ферментативном расщеплении прогормонов. Основной дипептид локализован также в N-концевом участке последовательности β-МСГ.

Энкефалин представляет собой участок в молекуле эндорфинов, необходимый для проявления их биологической активности,

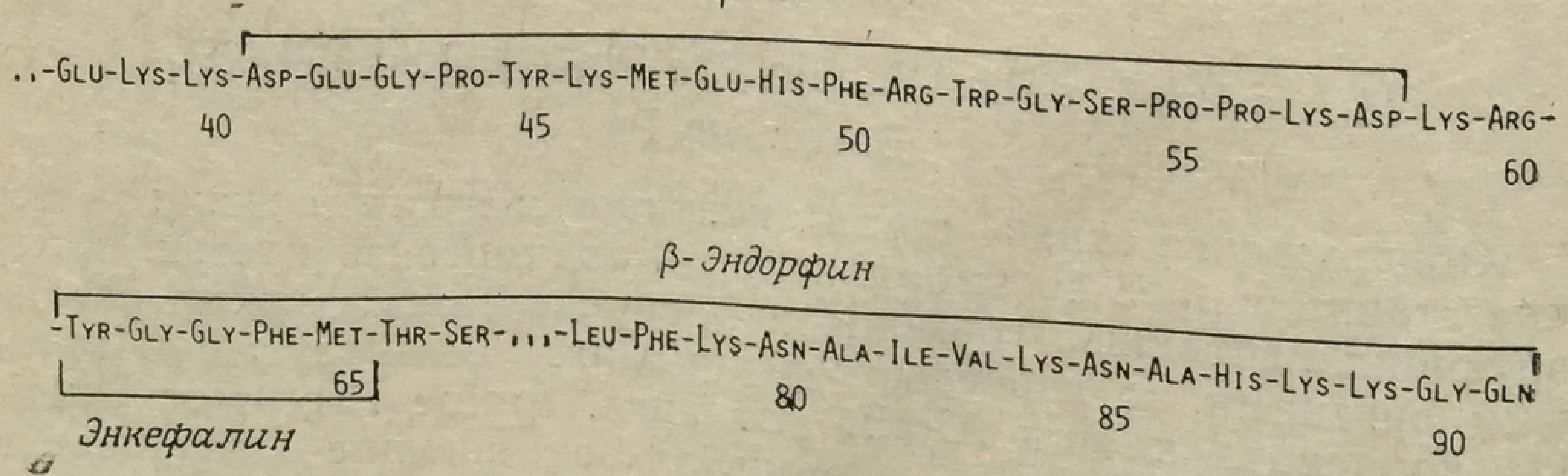

β-МСГ
..-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-Lys-Arg-
40
45
50
55
60
β-Эндорфин
-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-...-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln
65
80
85
90
Энкефалин

Рис. 1. Аминокислотная последовательность β-липотропина, содержащая последовательности β-меланоцитстимулирующего гормона (β-МСГ), энкефалина и β-эндорфина.

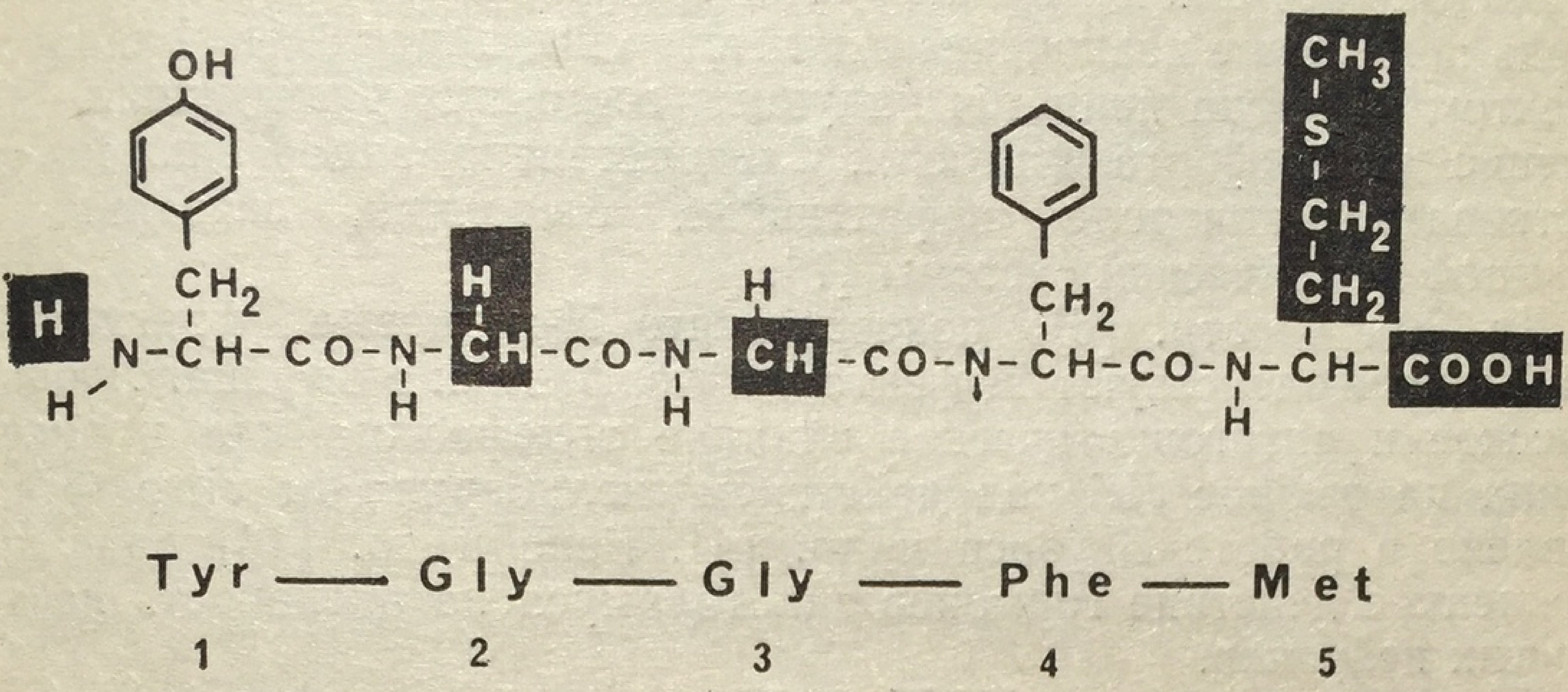


Рис. 2. Изменяемые остатки в энкефалине.

хотя сам по себе в некоторых биологических тестах энкефалин обладает относительно слабой активностью. В связи с этим энкефалин был химически модифицирован для получения аналогов со свойствами, аналогичными или превосходящими таковые морфина. На рис. 2 показана чувствительность различных участков энкефалина к структурной модификации. Светлые участки допускают только слабые изменения, темный фон — участки, требующие более глубокой или более обширной модификации для увеличения биологической активности.

N-концевая основная группа оказывается необходимой, но ее точное положение не фиксировано. Пептид, удлиненный остатком аргинина из 60-го положения липотропина, сохраняет биологическую активность [16]. Активность энкефалина увеличивается при замене одного из водородных атомов аминогруппы тирозина на метильную группу.

Тирозин чувствителен к модификации, однако глицин-2 может быть заменен D-аминокислотами, что приводит к заметному увеличению морфиноподобной активности [9, 12]. В глицине-3 успешным оказывается только замена CH на N, т. е. замена глицина азаглицином [9]. Фенольное кольцо фенилаланина имеет существенное значение, но и в этом случае N-метилирование увеличивает активность пептида [13]. Метионин допускает модификацию в широких пределах [1, 13]. Концевая карбоксильная группа оказывается несущественной. После этерификации, амидирования и даже восстановления до спирта активность пептида сохраняется [13].

На рис. 3 приведен пример сочетания нескольких таких замещений. Это соединение синтезировано Плессом и др. [13]. Оно в 5—10 раз активнее морфина при внутривенном введении и достигает эффективности морфина при пероральном введении.

Вполне возможно, однако, что опосредование анальгезии — отнюдь не главное назначение этих эндогенных пептидов. Главным эффектом морфина является индукция состояния равнодушия, облегчение дискомфорта или боли. Следовательно, эндорфины могут участвовать в контроле аффективных состояний, связанных с функцией лимбической системы [7].

Де Вид и сотр. [5] показали, что N-концевые фрагменты АКТГ противодействуют эффектам эндорфина и морфина. Агонистическое и антагонистическое влияние энкефалинамида и энкефалина на выброс ЛГ под действием люлиберина in vitro было выявлено в работе Бауэрса и др. [4]. Рено и др. [14] описали выраженное действие гормонов гипоталамуса на активность центральных нейронов.

Последовательности АКТГ, МСГ и люлиберина, которые, возможно обусловливают эти эффекты, оказываются близкородственными. Согласно Виганту и др. [17], гептапептидная последовательность Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, общая для АКТГ, МСГ и ЛПГ (липотропина), улучшает способность к обучению и память. В МСГ эта последовательность необходима для проявления меланотропной активности. Обе биологические функции отражают процессы адаптации к окружающей среде.

На рис. 4 суммированы некоторые аналогии между β-липотропином и другими гормонами. Они распространяются от общей трипептидной последовательности Glu-His-Phe, обнаруживаемой также в бомбинине — пептиде из кожи лягушки *Bombina variegata* [2], до тесной взаимосвязи между фрагментом α-МСГ и люлиберином.

На рис. 5 хорошо видна аналогия между α-МСГ и люлиберином. Аминокислотные остатки на черном фоне оказываются в идентичных положениях при условии удаления лейцина в 6-м положении люлиберина. Аминокислотные остатки на сером фоне связаны между собой как взаимозамещения, обусловленные точковыми мутациями в соответствующих триплетах ДНК. Ароматиче-

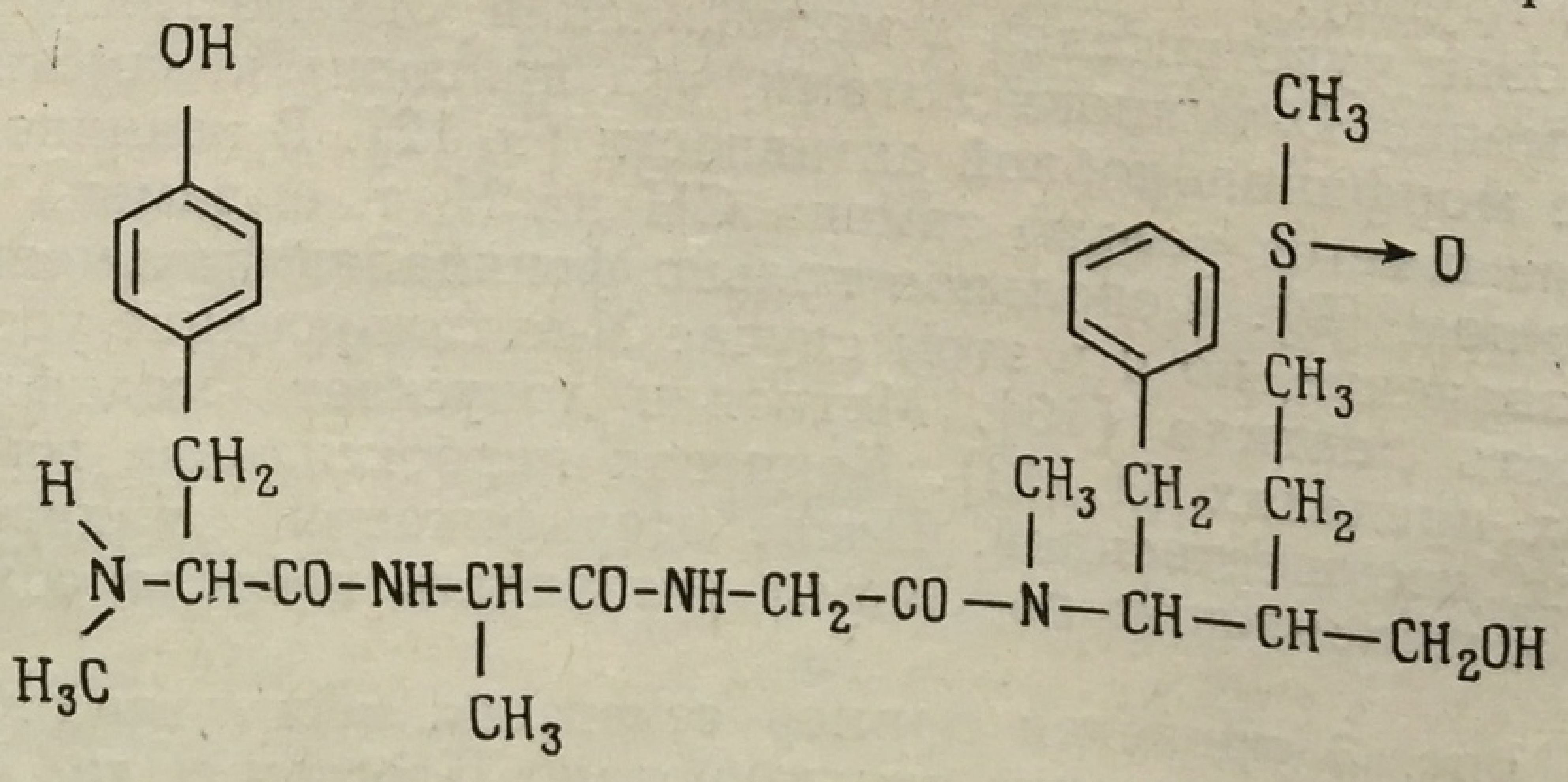


Рис. 3. NαMe-Tyr-D-Ala-Gly-Nα-Me-Phe-Met(O)-ол [8].

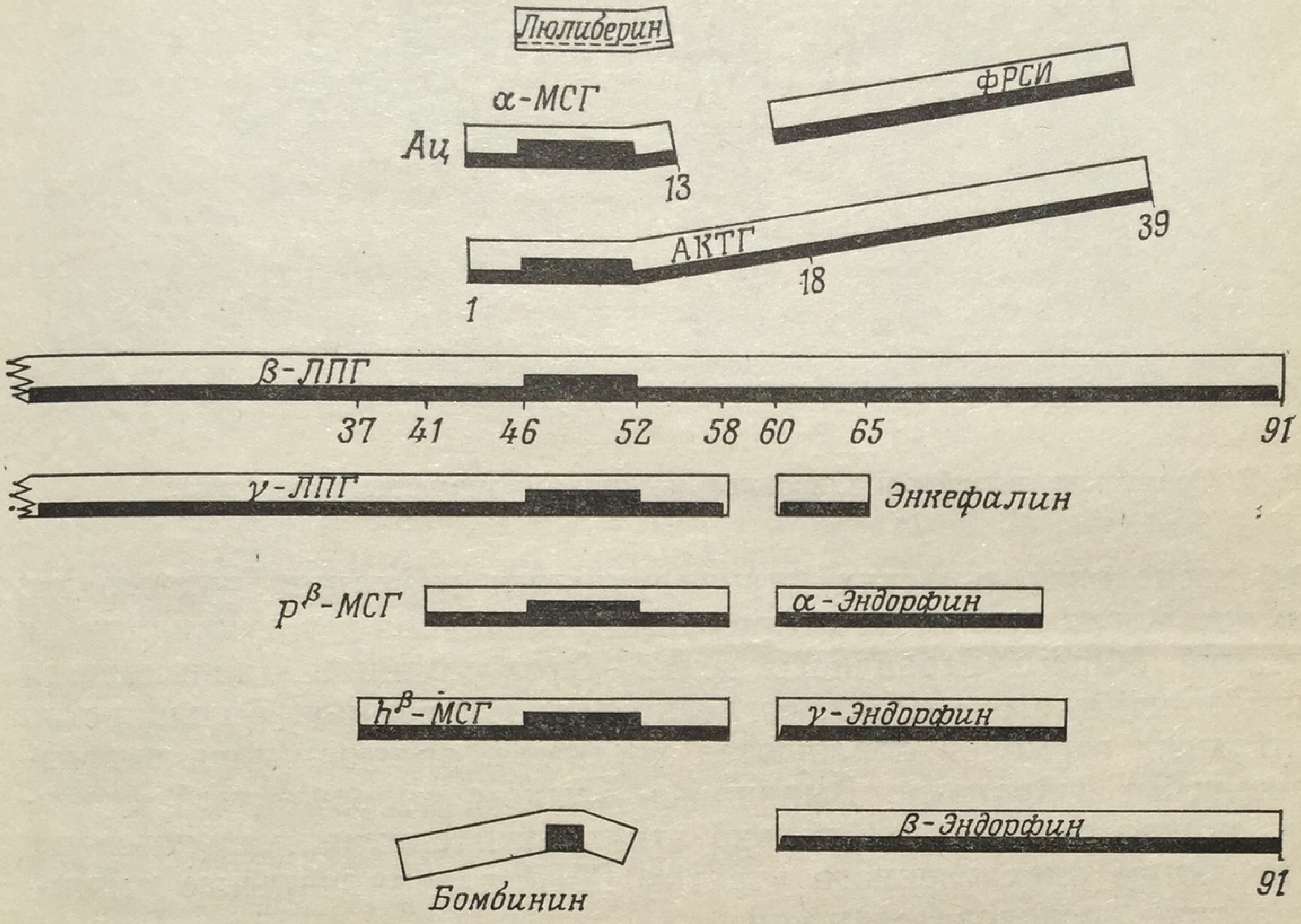


Рис. 4. Аналогии в семействе ЛПГ — АКТГ. Наклон полосы обозначает отсутствие сходства. ФРСИ — фактор, регулирующий секрецию инсулина.

ские аминокислоты замещаются только в результате двойных точковых мутаций. Примечательно, что ароматический характер аминокислот в этих положениях сохраняется.

Другая интересная аналогия существует между люлиберином и пептидом, описанным недавно Сакураи и др. [15]. Функция этого пептида связана с примитивным проявлением половой активности, поскольку он является индуктором половой агглютинабельности у *Saccharomyces cerevisiae.* Сходство это удивительно и даже более выражено, чем сходство между люлиберином и α-МСГ (рис. 6).

Участие обоих пептидов в половых функциях носит, должно быть, случайный характер, поскольку структуры мишеней (мембраны дрожжевых клеток, а также мембраны гипофиза и клеток мозга позвоночных) совершенно различны. Однако этот пример показывает, что структуры, используемые для гуморального переноса информации у высших организмов, возможно, существовали еще до того, когда размер и организация клеточных агрегатов сделали необходимым существование сложных информационных систем.

Многочисленные соответствия между большинством пептидных гормонов и частые повторения родственных блоков в аминокислот-

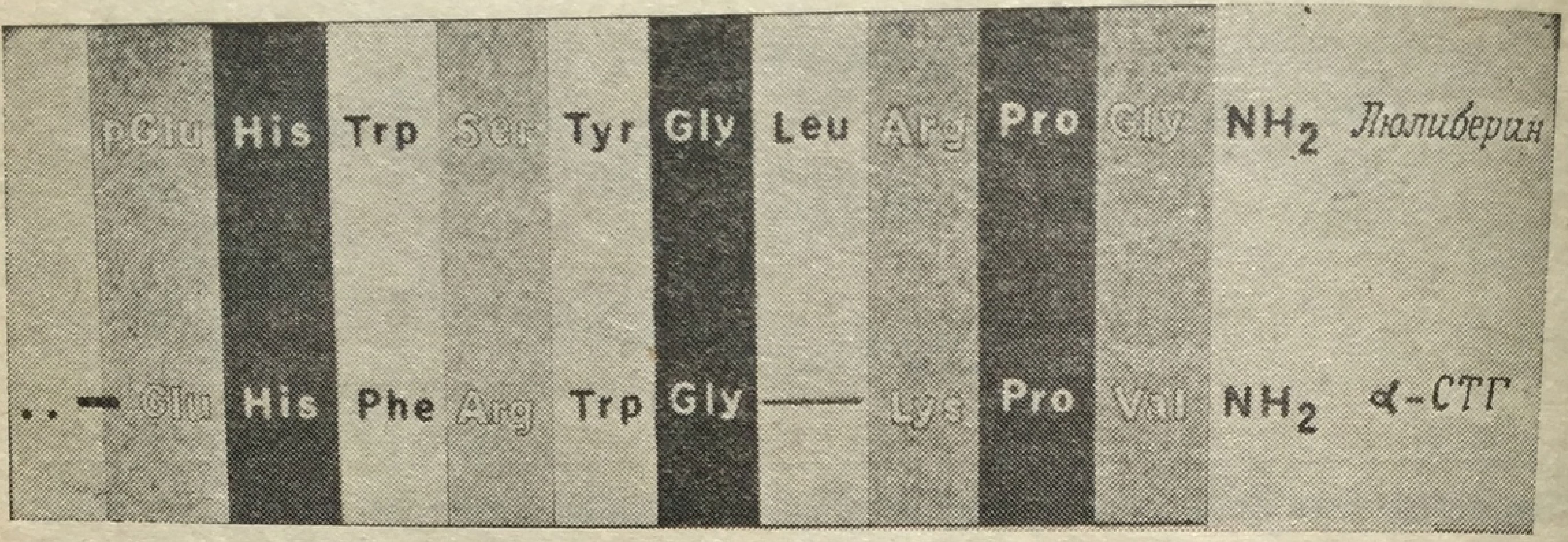

pGlu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly NH$_2$ Люлиберин
.. — Glu His Phe Arg Trp Gly —— Lys Pro Val NH$_2$ α-СТГ

Рис. 5. Сравнение люлиберина и α-меланоцитстимулирующего гормона.

ных последовательностях индивидуальных гормонов указывают, что они могли возникнуть в результате чередования дупликаций и мутаций общего первичного гена. Этот принцип дополняется концепцией клеток APUD, согласно которой все или большинство пептидных гормонов образуются клетками, являющимися видоизмененными нейронами. Выражаясь языком молекулярной биологии, можно сказать, что только эти клетки специализируются на трансляцию определенного участка ДНК в гормональные аминокислотные последовательности.

Реактивность даже высокодифференцированных клеток остается зависимой от архаических механизмов, таких, как транспорт ионов через мембраны и их регуляция взаимодействием органических молекул. Представляется вероятным, что развитие новых структур и новых функций в белковой части мембран следует общему эволюционному правилу. Другими словами, принцип «первого камня» также может быть принят во внимание.

В настоящее время мы не имеем существенных доводов в пользу этой концепции. Однако на рис. 7 представлено сравнение биологических активностей аналогов люлиберина и АКТГ. Последовательности, о которых идет речь, структурно родственны, но гормоны действуют на разные клетки в гипофизе и надпочечнике.

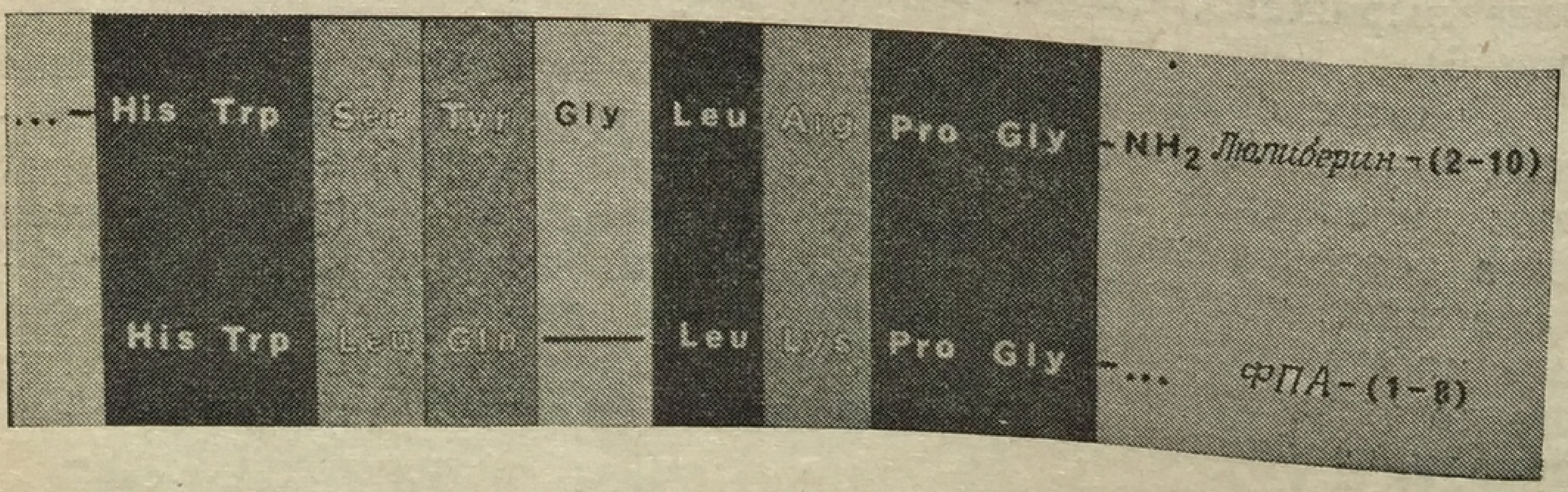

...- His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly -NH$_2$ Люлиберин-(2-10)
His Trp Leu Gln —— Leu Lys Pro Gly -... ФПА-(1-8)

Рис. 6. Сравнение люлиберина и фактора половой агглютинабельности (ФПА) дрожжей.

АКТГ	Активность АКТГ	Люлибирин	Активность люлиберина
...-Phe-Arg-Trp-Gly-... 7 8 9 10	100	...-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 7 8 9 10	100
——Har——	25	——Har——	22
——Lps——	6	——Lys——	8
——Orn——	5	——Orn——	6
—— x ——	0,1	—— x ——	<1

x—нейтральная аминокислота

Рис. 7. Биологическая активность аналогов АКТГ и люлиберина с замещениями в положении 8.

Параллельные модификации в соответствующем положении ведут к одинаковым изменениям биологической активности в двух различных типах клеток-мишеней [6]. Это наблюдение можно объяснить, исходя из предположения о полной или частичной идентичности участков в рецепторах. Поскольку структурные модификации затрагивают участок, имеющий критическое значение для гормональной активности обоих пептидов, он, возможно, опосредует один и тот же первичный эффект. Специфичность для различных клеток обеспечивается прилежащими аминокислотными последовательностями, связывающимися с соседними участками рецепторов.

Таким образом, обширная сеть взаимосвязей пронизывает клетки, продуцирующие гормоны, т. е. являющиеся медиаторами сигналов, и клетки, воспринимающие эти сигналы. Появление таких пептидов, как гландулярные, или местные, гормоны и нейромедиаторы или нейроэндокринные медиаторы, также подтверждает унитарную концепцию при рассмотрении некоторых основных принципов на молекулярном уровне.

Список литературы

1. *Bajusz S., Rónai A. Z., Szekely J. I., Gráf L., Dunai-Kovacs Z., Berzetei I.* FEBS Letters, **76**, 91—92 (1977).
2. *Bertaccini G.* Pharm. Reviews, **28**, 127—177 (1976).
3. *Bloom F., Segal D.. Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
4. *Bowers C. Y., Chang J., Momany F., Lam Y., Knudsen R., Folkers K.* In: Proc. Endocrinology, eds. I. MacIntyre and A. G. E. Pearse, Elsevier, Amsterdam (1977). In press.
5. *DeWied D.* Proc. Soc. exp. Biol. Med., **122**, 28—32 (1966).
6. *Geiger R., König W., Sandow J., Schally A. V.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 1526—1534 (1974).
7. *Goldstein A.* Science, **193**, 1081—1086 (1976).
8. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature (Lond.), **258**, 577—579 (1975).
9. *Morley J. S.* Lecture given at the EMBO Workshop on Hormone Fragments and Diseases, Leiden, The Netherlands, May 15—18 (1977).
10. *Oliver C., Eskay R. L., Porter J. C.* In: Proc. 5th Int. Congr. Endocrinol., Hamburg, pp. 243—244 (1976).

11. *Pearse A. G. E.* Proc. Royal Soc., B, **170**, 71—80 (1968).
12. *Pert C. B., Pert A., Chang J. K., Fong B. T. W.* Science, **194**, 330—332 (1976).
13. *Ples J., Bauer W., Cardinaux F., Vlosse A., Hauser D., Huguenin R., Romer D., Buscher H. H., Hill R. C.* In: Proc. Endocrinology, eds. I. MacIntyre and A. G. E. Pearse, Elsevier, Amsterdam (1977). In press.
14. *Renaud L. P., Martin J. B., Brazeau P.* In: The Neuropeptides: Pharmacology, Biochemistry and Behavior, Vol. 5, Suppl. 1, 171—178, ANKHO International, Inc. (1976).
15. *Sakurai A., Tamura S., Yanagishima N., Shimoda C.* Agric. Biol. Chem., **41**, 389—398 (1977).
16. *Wahlström A., Brandt M., Moroder L., Wünsch E., Lindeberg G., Ragnarsson U., Terenius L., Hamprecht B.* FEBS Letters, 77, 28—32 (1977).
17. *Wiegant V. M., Gispen W. H., Terenius L., DeWied D.* Psychoneuroendocrinology, 2, 63—69 (1977).

РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИЙ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ИХ ЛИГАНДОВ

Г. В. КОСТЕРЛИЦ, Д. ХЬЮС

(H. W. Kosterlitz, J. Hughes)

Введение

Цель данного сообщения состоит в том, чтобы очертить некоторые важные исторические аспекты в развитии исследований лигандов опиатных рецепторов.

Хотя опий и его алкалоиды, морфин и кодеин, используются уже давно, изучение механизма их действия было затруднено вследствие сложной и неоднотипной структуры центральной нервной системы. Следовательно, возникала необходимость исследовать относительно простые модели. Начало таких попыток восходит к работам Тренделенберга [60], который показал, что перистальтика, вызванная в изолированном сегменте подвздошной кишки морской свинки повышением давления в просвете, может быть подавлена морфином, взятым в концентрациях, сходных с теми, которые обнаруживаются после одноразового введения его терапевтической дозы. Эта работа получила дальнейшее развитие [34, 35, 44], и было показано, что рецепторы морфина в тонком кишечнике морских свинок могут быть использованы для предсказания эффективности обезболивающих препаратов у человека. а их эффекты конкурентно подавляются наркотическими антагонистами — налоксоном и налтрексоном. Второй моделью, предложенной позже, является vas deferens мыши, характеризующийся неадренэргической передачей [27]. Относительные чувствительности модельных объектов к морфину и его классическим полусинтетическим и синтетическим заменителям тесно коррелируют между собой, однако обнаруживаются значительные различия в ответах моделей на опиоидные пептиды. Наблюдаемые различия привели к представлению о существовании более чем одного класса опиатных рецепторов, о чем пойдет речь ниже.

Эти исследования фармакологических препаратов in vitro, проводившиеся вначале на тканях, иннервированных периферической автономной нервной системой, вскоре были перенесены на центральную нервную систему. Там были выявлены специфические места узнавания, с которыми тритированные лиганды, такие, как дигидроморфин, эторфин и налоксон, связывались насыщаемым и стереоспецифическим образом [49, 55, 57]. Было показано, что у многих видов позвоночных имеются участки связывания опиатов, распределенные в головном и спинном мозгу, и что плотность этих участков в различных областях мозга оказывается различной [37, 47]. Такое распределение может быть основой довольно избирательного действия опиатов в центральной нервной системе. Связывание меченых лигандов подавлялось наркотическими анальгезирующими препаратами и их антагонистами, причем степень подавления тесно коррелировала с фармакологической активностью использованного соединения.

Нам и другим исследователям, работавшим в этой области, казалось маловероятным, чтобы такие хорошо выявляемые и специфические рецепторы возникли случайно; в течение некоторого времени в обсуждениях и в статьях часто высказывалось предположение, что эти рецепторы могут быть предназначены для одного или более эндогенных соединений, действие которых имитируется опиатами. В правильности этой точки зрения нас убеждают два соображения.

Первое соображение носит общий характер. Известно, что определенные алкалоиды, обнаруживаемые в растениях, имеют функциональные корреляты в животных тканях. И вот, несмотря на некоторое структурное сходство между двумя классами соединений, растительные алкалоиды оказываются, как это ни удивительно, резистентными к действию ферментов животных тканей и в результате часто ведут себя как эффективные нейротоксины. В качестве примера такой пары можно привести мускарин из ядовитого гриба *Amanita muscaria* и нейромедиатор ацетилхолин, никотинэргическое действие которого в свою очередь имитируется никотином из растения табака. *Amanita muscaria* содержит также мусцимол, коррелятом которого в животных тканях является гамма-аминомасляная кислота. Опиоидные пептиды, как теперь известно, соответствуют морфину и кодеину из *Papaver somniferum*.

Второе соображение опиралось на сообщение Акила и др. [1] о том, что электрическая стимуляция перицентрального серого вещества среднего мозга крыс ведет к увеличению латентности ответа на вредные стимулы и что этот эффект обращается антагонистом морфина — налоксоном.

При создании отдела изучения наркотических средств в Абердинском университете в октябре 1973 г. было решено, что одной из важнейших задач отдела будет поиск эндогенных лигандов. В исследованиях такого рода чрезвычайно важно, чтобы прослеживание степени очистки исследуемого вещества было эффективным и обладало высокой специфичностью. В этом плане мы имели значительное преимущество, поскольку могли использовать все высокоспецифичные биологические тест-системы, а именно подавление вызванных электрическим током сокращений подвздошной кишки морской свинки и vas deferens мыши и обращение ингибирующего действия опиатов специфическими антагонистами [27, 34, 35]. В качестве антагонистов мы имели в своем распоряжении не только налоксон и налтрексон, но также очень быстродействующее четвертичное соединение налорфиний и па́ры оптических изомеров антагонистов бензоморфановой серии [65]. С помощью этих средств удалось установить наиболее важную особенность — стереоспецифичность антагонизма. Наличие более чем одной системы тестирования оказалось чрезвычайно удачным в связи с различной чувствительностью подвздошной кишки морской свинки и vas deferens мыши.

Через три месяца после начала работы стало очевидным, что в экстрактах мозга присутствуют энкефалины [25]. Примерно в то же самое время были получены данные о наличии пептидов со сродством к опиатным рецепторам в мозгу и подвздошной кишке морской свинки [59]. Но только в начале осени 1975 г. структура энкефалинов была окончательно установлена. Главная причина этой задержки заключалась в следующем: вплоть до последней стадии очистки мы не подозревали, что в экстрактах находились два близкородственных олигопептида [29]. Хроматографические свойства мет-энкефалина и лей-энкефалина оказались очень близкими, и соединения эти не разделялись при высоковольтном электрофорезе. Доктор Линда Фозергилл на биохимическом факультете Абердинского университета быстро установила последовательность первых четырех аминокислот (Tyr-Gly-Gly-Phe), но не смогла установить локализацию обнаруживаемых в препарате метионина и лейцина. Нам посчастливилось работать в сотрудничестве с

10
H-Glu-Leu-Thr-Gly-Gln-Arg-Leu-Arg-Gln-Gly-
20
Asp-Gly-Pro-Asn-Ala-Gly-Ala-Asn-Asp-Gly-
30
Glu-Gly-Pro-Asn-Ala-Leu-Glu-His-Ser-Leu-
40
Leu-Ala-Asp-Leu-Val-Ala-Ala-Glu-Lys-Lys-
50
Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-
60
Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-Lys-Arg-
70
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
80
Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-
90
Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-
Glu-OH.

Рис. 1. Аминокислотная последовательность β-липотропина человека [39].

доктором Говардом Моррисом из Лондонского королевского колледжа, который показал с помощью масс-спектрометрии, что на деле существует два различных пентапептида — мет-энкефалин и лей-энкефалин.

Одно из самых волнующих событий произошло вскоре после того, как доктор Моррис установил структуру пентапептидов. Доктор Дерек Смит из Национального института медицинских исследований, выступая с докладом о прогормоне β-липотропине (рис. 1) в Королевском колледже, продемонстрировал структуру его С-концевого фрагмента, или липотропина$_{61-91}$, который сейчас более известен как β-эндорфин. К великому удивлению Говарда Морриса, оказалось, что первые пять аминокислот С-фрагмента имеют структуру мет-энкефалина (β-липотропин$_{61-65}$). Вскоре Дерек Смит и его коллеги [6, 7] быстро установили неизвестный ранее факт, что β-липотропин$_{61-91}$ обладает высоким сродством к опиатным рецепторам. Мы показали, что этот фрагмент подавляет сокращение подвздошной кишки морской свинки и vas deferens мыши и что эти эффекты обращаются налоксоном [66].

Мы послали копию корректуры нашей статьи от 18 декабря 1975 г. [29], в которой была приведена структура пентапептидов, нашим друзьям и конкурентам, работающим в этой области. Несколько позднее я получил письмо от доктора Ли из Лаборатории исследования гормонов в Сан-Франциско, в котором он описывал следующие события. 11 декабря 1975 г. доктор Авраам Голдстайн из Стэндфордского университета написал письмо доктору Ли с просьбой предоставить ему препараты пептидов, родственных фрагментам β-липотропина. 16 декабря доктор Ли показал это письмо доктору Роджеру Гуиллемину из Института Солка, навестившему в этот день доктора Ли. Это было началом периода, в течение которого из этих лабораторий вышли важные исследовательские работы [10, 20].

Распределение энкефалинов и эндорфинов

Энкефалины неравномерно распределены в мозгу, так что их концентрация особенно высока в полосатом теле (стриатуме) и гипоталамусе и относительно низка в коре и ниже измеримого уровня в мозжечке [54, 56]. В ауэрбаховом сплетении подвздошной кишки морской свинки концентрация энкефалинов почти так же высока, как и в полосатом теле [28]. В полосатом теле кролика молярное соотношение длинноцепочечных эндорфинов и энкефалинов равно примерно 0,5, тогда как в гипофизе кролика это соотношение оказывается порядка 1700. В ауэрбаховом сплетении до последнего времени не обнаружено никаких длинноцепочечных эндорфинов. В мозгу морских свинок соотношение мет-энкефалина и лей-энкефалина оказывается самым низким в коре и самым высоким в гипоталамусе.

Важные результаты получены при иммуногистохимическом изучении мозга крыс [15, 23, 24, 53]. Наибольшая плотность энкефалинов обнаружена в пластинах I и II спинного мозга, в substantia gelatinosa (желатинозном веществе) ядра спинального тракта тройничного нерва, вагусных ядрах, в перивентрикулярной и периакведуктальной областях верхнего мозгового слоя и среднего мозга, в дорсомедиальных таламических участках, в перивентрикулярном и вентральном участках гипоталамуса, в бледном шаре и центральном ядре миндалины. Иммунофлуоресценция связана главным образом с нервными волокнами и их окончаниями. Тела нейронов приобретают способность к иммунофлуоресценции только в случае предварительного введения крысам колхицина, блокирующего аксонный транспорт; флуоресцирующие тела нейронов в этом случае характеризуются широким распределением, аналогичным распределению нервных волокон и терминалей [23, 24]. Интересно отметить, что иммунофлуоресценция, связанная с энкефалинами, хорошо соответствует иммунофлуоресценции, связанной с веществом Р, особенно в пластинах I и II спинного мозга и в маргинальном слое ядра спинального тракта тройничного нерва; нервные терминали, дающие положительную реакцию на вещество Р, относятся, по-видимому, к центральным разветвлениям первичных афферентных нейронов [35]. Подавление опиоидными пептидами выброса вещества Р может быть связано с пресинаптическим торможением опиоидными пептидами нейронов, передающих вредные стимулы путем выброса вещества Р [12, 24, 31].

Длинноцепочечные эндорфины, как было показано, содержатся в высокой концентрации в передней и промежуточной долях гипофиза [3, 5, 10] и в значительно более низкой концентрации в различных участках мозга [28, 36].

Метаболизм энкефалинов и эндорфинов

Данные пентапептиды эффективно разрушаются аминопептидазами, присутствующими в центральной нервной системе [21, 42]. Более длинные пептиды оказываются значительно более резистентными к действию экзопептидаз мозга, но разрушаются эндопептидазами [26, 48]. В связи с этим интересно отметить, что в неочищенном гомогенате гипофиза β-липотропин расщепляется по участку 77—78; такое расщепление, возможно, превращает β-эндорфин в значительно менее активный γ-эндорфин [19].

Что касается синтеза опиоидных пептидов, то имеется мало определенных данных о природе их предшественников. Если β-липотропин и β-эндорфин являются предшественниками мет-энкефалина, то для лей-энкефалина не известны соответствующие более длинные пептиды, содержащие в себе его последовательность. Иммунореактивные β-липотропин и β-эндорфин обнаруживаются не только в гипофизе, но также и в мозгу взрослых особей крупного рогатого скота, где они распределены неравномерно [36]. При инкубации препаратов ауэрбахова сплетения подвздошной кишки морской свинки с тритированным тирозином in vitro наблюдается включение меченого тирозина в энкефалины, причем удельная радиоактивность мет-энкефалина оказывается выше, чем лей-энкефалина. Аналогичные результаты получены при исследовании мозга крысы после внутрицистернальной инъекции ^{3}H-тирозина (неопубликованные наблюдения авторов и сотр.).

Выброс энкефалинов может наблюдаться в неочищенных препаратах синаптосом из мозга крыс при повышении концентрации K^+; этот процесс оказывается Ca^{2+}-зависимым [56]. Косвенные данные о выбросе энкефалинов в ответ на электрическую стимуляцию получены в опытах с подвздошной кишкой морской свинки, где выброс ацетилхолина межмышечным сплетением увеличивается налоксоном [65]. Аналогично длительная электрическая стимуляция того же препарата при частоте 10 Гц приводит к подавлению последующего сокращения, вызванного стимуляцией с частотой 0,1 Гц; этот эффект обращается налоксоном [50]. В обоих типах экспериментов была показана стереоспецифичность антагонизма благодаря использованию (+)- и (—)-изомеров (—)-2-аллил-β-9-метил-5-фенил-2′-окси-6,7-бензоморфана (GPA 1843 и 1847). При стимуляции межмышечного сплетения с частотой 0,1 Гц в течение нескольких часов выброс энкефалинов может быть продемонстрирован с помощью биологического теста на vas deferens мыши и радиоиммунологического теста [51].

Взаимодействие опиоидных пептидов и опиатных рецепторов

Предполагается, что некоторые опиоидные пептиды, мет-энкефалин, лей-энкефалин, β-эндорфин и α- и γ-эндорфины взаимодействуют более чем с одним типом опиатных рецепторов [41]. Рецепторы с различными связывающими свойствами могут быть дифференцированы благодаря использованию антагонистов, специфических для различных рецепторов. Если такие антагонисты неизвестны, то оценивается активность агонистов в различных системах in vitro. В случае параллельного изменения порядка относительных активностей можно предполагать, что исследуемые ткани имеют идентичные рецепторы, в противном же случае популяции рецепторов различны [9].

АКТИВНОСТЬ β-ЭНДОРФИНА И ЕГО ФРАГМЕНТОВ

Мы показали, что β-эндорфин (β-липотропин$_{61-91}$) в одинаковой степени подавляет сокращение подвздошной кишки морской свинки и vas deferens мыши; кроме того, он с равной активностью подавляет связывание трех лигандов, а именно ^{3}H-налтрексона, ^{3}H-дигидроморфина и ^{3}H-лей-энкефалина в гомогенатах мозга морских свинок (табл. 1).

Таблица 1

Ингибирующая активность (IC_{50}; нМ) β-эндорфина[1]

Подвздошная кишка морской свинки	37,7±4,0(6)
Vas deferens мыши	48,6±11,7(4)
Связывание 0,4 нМ ^{3}H-налтрексона	2,93±0,49(3)
Связывание 0,8 нМ ^{3}H-дигидроморфина	2,90±0,39(4)
Связывание 0,86 нМ ^{3}H-лей-энкефалина	2,98±0,46(3)

[1] Данные представлены как среднее значение±средняя ошибка; в скобках показано число измерений. β-Эндорфии представляет собой синтетический пептид свиньи (получен от доктора Гуиллемина и доктора Линга). Условия, в которых проводили связывание: 0 °С, рН 7,4, без Na^{+}, 150 мин икубации в гомогенате мозга морской свинки.

Поскольку было показано, что α-эндорфин (липотропин$_{61-76}$) менее активен, чем β-эндорфин, в подвздошной кишке морской свинки, но более активен в vas deferens мыши [41], то представлялось интересным исследовать другие фрагменты β-эндорфина в четырех параллельных тест-системах (табл. 2). Активность фрагментов, представленных в этой таблице, отнесена к принятой за единицу активности β-эндорфина.

Таблица 2

Относительные эффективности (β-эндорфин-1)[1]

Аминокислотные остатки	Подвздошная кишка морской свинки (П. к. м. с.)	Vas deferens мыши (V. d. м.)	П. к. м. с./V. d. м.	Связывание ^{3}H-дигидроморфина (Дгм)	Связывание ^{3}H-лей-энкефалина (Лей-энк)	Дгм/Лей-энк
61—91	1	1	1	1	1	1
61—87	0,28	0,47	0,6	0,15	0,16	0,9
61—79	0,15	0,91	0,16	0,04	0,07	0,6
61—77	0,12	1,44	0,08	0,02	0,05	0,4
61—76	0,13	1,35	0,1	0,03	0,17	0,18
61—65	0,29	3,14	0,09	0,44	2,33	0,19

[1] Источники: аминокислотные остатки 61—65 получены от д-ра Моргана (Reckitt and Colman); остальные пептиды — от д-ров Гуиллемина и Линга.

Оказалось, что в подвздошной кишке морской свинки и при подавлении связывание ^{3}H-налоксона и ^{3}H-дигидроморфина в гомогенатах мозга морских свинок β-эндорфин обладает наибольшей активностью и за ним следует в порядке снижения активности мет-энкефалин и липотропины $_{61-87,\ 61-79}$ и $_{61-77}$. В vas deferens мыши при подавлении связывания ^{3}Н-лей-энкефалина наиболее эффективным среди всех прочих фрагментов, включая β-эндорфин (липотропин$_{61-91}$), оказывается мет-энкефалин. Тот факт, что длинноцепочечный пептид липотропин$_{61-91}$ обладает одинаковой эффективностью в различных тест-системах, а короткоцепочечные пептиды более различаются по сродству к различным рецепторам, может иметь физиологическое значение.

МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ ЭНКЕФАЛИНА

При увеличении резистентности мет-энкефалина к деградирующему действию аминопептидаз замещением Gly-2 на D-Ala активность пептида увеличивается в обоих препаратах ткани in vitro в равной степени; одновременно при этом наблюдается снижение активности пептида в подавлении связывания ^{3}Н-налоксона, а ингибирующее действие на связывание ^{3}Н-лей-энкефалина не изменяется (табл. 3). Следовательно, можно принять, что изменения активности в препаратах in vitro обусловлены главным образом снижением ферментативной деградации.

Таблица 3

Относительная активность[1]

Соединение	Подвздошая кишка морской свинки (П. к. м. с.)	Vas deferens мыши (V. d. м.)	П. к. м. с./V. d. м.	Подавление связывания 3Н-налоксона (нал)	Подавление связывания 3Н-лей-энкефалина (лей-энк)	Нал/лей-энк
Мет-энкефалин	1	1	1	1	1	1
N-CH$_3$-мет-энкефалин-амид	3,7	0,33	11	1,2	0,08	15
D-ala^2-мет-энкефалин	6,0	5,6	1,1	0,54	1,7	0,32
Морфин	1,4	0,024	58	0,39	0,005	78

[1] Активность мет-энкефалина принята условно за единицу. Источник: мет-энкефалин и D-Ala^2-мет-энкефалин получены от д-ра Моргана (Reckitt and Colman); N-CH$_3$-мет-энкефалинамид — от д-ров Брэдбери и Смита.

Если, однако, увеличение резистентности к пептидазам вызвано амидированием карбоксильной группы метионина и введением метильной группы в аминогруппу тирозина [7], то образующийся в результате N-CH$_3$-мет-энкефалинамид оказывается более эффективным в подвздошной кишке морской свинки, но теряет активность в vas deferens мыши; подавление связывания ^{3}Н-лей-энкефалина снижается более чем на 90%, а ингибирующее действие на связывание ^{3}H-налоксона не изменяется. В связи с различным изменением активности пептида в различных тест-системах эти изменения нельзя объяснить снижением скорости ферментативной деградации. В отличие от аналога, содержащего D-аланин во 2-м положении, N-CH_3-мет-энкефалинамид по характеру своей активности оказывается ближе к морфину. Эти изменения активности следует иметь в виду при использовании аналогов энкефалина в изучении их физиологических эффектов.

На основании приведенных исследований была выдвинута гипотеза о том, что популяции рецепторов в межмышечном сплетении подвздошной кишки морской свинки и vas deferens мыши неоднородны и неидентичны. Убедительным доводом в пользу этой точки зрения служит тот факт, что в подвздошной кишке морской свинки налоксон в равной степени противодействует морфину и опиоидным пептидам, тогда как в vas deferens для подавления эффекта энкефалинов и эндорфинов требуется в 10 раз более высокая доза налоксона, чем для подавления эффекта морфина [41]. В подвздошной кишке морской свинки пептиды взаимодействуют главным образом с μ-рецепторами, типично опосредующими действие морфиноподобных средств. В vas deferens мыши пептиды взаимодействуют главным образом с σ-рецепторами. μ-Рецепторы могут соответствовать участкам связывания в мозгу и подвздошной кишке морских свинок, характеризующимся высоким сродством к ^{3}H-налоксону, ^{3}H-налтрексону и ^{3}H-дигидроморфину [11, 57], тогда как σ-рецепторы соответствуют участкам связывания в мозгу с высоким сродством к ^{3}H-лей-энкефалину. Недавно с помощью аналогичных экспериментов было показано, что гибридные клетки нейробластома×глиома обладают только «энкефалиновыми участками», соответствующими нашим σ-рецепторам, а синаптические мембраны мозга крысы содержат, кроме того, «морфиновые участки», соответствующие нашим μ-рецепторам [63].

Различия в рецепторах vas deferens у разных линий мышей

Было показано, что активность морфина в болеутоляющем и других поведенческих эффектах варьирует у разных линий мышей [43]. Обнаруживаются также различия в количестве опиатных рецепторов, выявляемых по связыванию ^{3}H-налоксона [2]. Чувствительность vasa deferentia к морфину также у разных линий различна. Так, в частности, у мышей C57/BL для индукции ответа требуются значительно более высокие концентрации морфина, чем у мышей линии TO [22]. В связи с этим представлялось интересным сравнить чувствительность vasa deferentia мышей C57/BL и TO к опиоидным пептидам. Данные, приведенные в табл. 4, пока-

Таблица 4

Агонистическая активность (IC_{50}; нМ) в vasa deferentia мышей ТО и C57/BL[1]

Агонист	Мыши ТО	Мыши C57/BL
Норморфин	350±36 (26)	2027±411 (17)
Мет-энкефалин	17,7±1,7 (26)	13,2±1,4 (17)
Лей-энкефалин	7,8±0,8 (9)	8,1±1,5 (4)
D-Ала^2-метэнкефалин	2,1±0,4 (4)	2,1±0,2 (3)
β-Эндорфин	48,6±11,7 (4)	94±16,4 (3)

---

[1] Значения представляют собой среднее±средняя ошибка; в скобках приведено количество наблюдений. β-Эндорфин получен от д-ров Гуиллемина и Линга, а остальные пептиды — от д-ра Моргана (Reckitt and Colman).

зывают, что мет-энкефалин, лей-энкефалин и D-Ala^2-мет-энкефалин обладают соответственно одинаковым действием на vasa deferentia как мышей C57/BL, так и мышей ТО, тогда как морфин в 6 раз более активен в препаратах из мышей ТО по сравнению с препаратами из мышей C57/BL. β-Эндорфин вдвое менее эффективен у мышей C57/BL по сравнению с мышами ТО. Приведенные данные показывают, что vasa deferentia мышей обеих линий одинаково чувствительны к пептидам, действующим на σ-рецепторы, но ответ на вещества, взаимодействующие с μ-рецепторами, у мышей C57/BL значительно ниже, чем у мышей ТО.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

Анализ возможных физиологических функций опиоидных пептидов все еще находится на самых начальных стадиях. В связи с этим следует соблюдать большую осторожность, чтобы не попасть во власть спекуляций, построенных на ненадежных экспериментальных результатах. В принципе весьма вероятно, что опиоидные пептиды могут имитировать такие эффекты морфина, как прекращение ощущения боли, подавление дыхания, запоры, изменения в экстрапирамидной моторной системе и эйфорические изменения настроения. Еще более вероятно, что физиологическое действие различных пептидов, длинноцепочечных эндорфинов и короткоцепочечных энкефалинов характеризуется тонкими различиями.

Природные мет-энкефалин и лей-энкефалин обладают слабым болеутоляющим действием даже после инъекции в желудочки или непосредственно в вещество мозга вследствие быстрой инактивации пептидазами. Резистентные к ферментам аналоги, такие, как D-Ala^2-мет-энкефалинамид или $N\text{-}CH_3$-Tyr^1-мет-энкефалинамид, обладают заметным антиболевым действием [17, 45].

Хотя более длинноцепочечные пептиды резистентны к действию экзопептидаз, их противоболевая эффективность варьирует в широких пределах. Особенно интересны в связи с этим β-эндорфин или С-фрагмент, поскольку его противоболевое действие после инъекции в желудочек мозга оказывается в крайнем случае равным или, по данным большинства исследователей, превышает таковое для морфина [5, 7, 16, 17, 40, 45]. Эффект β-эндорфина оказывается продолжительным, как и в случае устойчивых к ферментам пентапептидов, в отличие от кратковременного эффекта природных энкефалинов. Поскольку энкефалины характеризуются быстрым проявлением своего действия и вызванный ими эффект быстро погашается ферментативно, энкефалины являются хорошими кандидатами на возможную роль ингибиторных нейромедиаторов или нейромодуляторов.

Другой важный эффект опиоидных пептидов направлен на контроль моторной активности. Так, например, микроинъекция морфина или D-Ala^2-мет-энкефалинамида в аккумбентное ядро лимбического переднего мозга крыс вызывает гиперкинез животных, причем это состояние снимается налоксоном [46]. С другой стороны, инъекция β-эндорфина в периакведуктальное серое вещество, cisterna magna или боковой желудочек приводит к кататонии [4, 30, 62]. Мет-энкефалин оказывается неэффективным, но N-CH_3-Tyr^1-мет-энкефалинамид индуцирует кататонию [7].

Хорошо известно, что морфин стимулирует выброс пролактина и гормона роста из гипофиза. Было показано, что эти эффекты имитируются при внутрижелудочковой инъекции мет-энкефалина и β-эндорфина [13, 14, 18]. Два факта делают β-эндорфин особенно подходящим для такой эндокринной контрольной функции: его присутствие в высокой концентрации в гипоталамо-гипофизарной оси и его повышенная резистентность к ферментативной инактивации по сравнению с энкефалинами.

Толерантность и зависимость

При изучении приобретения зависимости было доказано, что все известные к настоящему времени пептиды обусловливают толерантность и зависимость [8, 38, 61, 64, 67].

В связи с этим возникает интересный вопрос: зависимы ли мы от своих собственных энкефалинов и эндорфинов? Ответ на этот вопрос отрицательный, поскольку налоксон вызывает очень мало эффектов у нормальных животных даже в высоких дозах, хотя при введении малых доз налоксона морфинозависимым животным и человеку наблюдается синдром лишения. Эти наблюдения показывают, что в норме энкефалины и эндорфины хорошо изолированы в своих депо. После высвобождения они достаточно быстро инактивируются, так что опиатные рецепторы оказываются занятыми только временно, и в результате толерантность и зависимость не развиваются.

Список литературы

1. *Akil H., Mayer D. J., Liebeskind J. C.* C. r. hébd. Séances Acad. Sci., Paris D, **274**, 3603—3605 (1973).
2. *Baran A., Shuster L., Eleftheriou B. E., Bailey D. W.* Life Sci., **17**, 633—640 (1975).
3. *Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N.. Leppaluoto J., Vargo T. M., Guillemin R.* Life Sci., 20, 43—48 (1977).
4. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, N. Y., **194**, 630—632 (1976).
5. *Bradbury A. F., Feldberg W., Smyth D. G., Snell C. R.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 9—17, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
6. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Birdsall N. J. M., Hulme E. C.* Nature, Lond., **260**, 793—795 (1976).
7. *Bradbury A.F., Smyth D. G., Snell C. R., Deakin J. I. W., Wendlandt S.* Biochem. biophys. Res. Commun., **74**, 748—754 (1977).
8. *Brandt M., Fischer K., Moroder L., Wünsch E., Hamprecht B.* FEBS Lett., **68**, 38—40 (1976).
9. *Chang H. C., Gaddum J. H.*, J. Physiol. Lond., **79**, 255—285 (1933).
10. *Cox B. M., Goldstein A., Li C. H.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 1821—1823 (1976).
11. *Creese I., Snyder S. H.* J. Pharmacol. exp. Therap., **194**, 205—219 (1975).
12. *Cuello A. C., Emson P., del Fiaco M., Gale J., Iversen L. L., Jessel T. M., Kanazawa I., Paxinos G., Quik M.* In: Centrally acting Peptides, ed. J. Hughes, Macmillan, London (1977).
13. *Dupont A., Cusan L., Garon M., Labrie F., Li C. H.* Proc. Natn. Sci. USA, **74**, 358—359 (1977).
14. *Dupont A., Cusan L., Labrie F., Coy D. H., Li C. H.* Biochem. biophys. Res. Commun., **75**, 76—82 (1977).
15. *Elde R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
16. *Feldberg W., Smyth D. G.* J. Physiol. Lond., **260**, 30—31P (1976).
17. *Feldberg W., Smyth D. G.* Brit. J. Pharmacol., **60**, 445—453 (1977).
18. *Ferland L., Fuxe K., Eneforth P., Gustafsson J.-A., Skett P.* Eur. J. Pharmacol., **43**, 89—90 (1977).
19. *Gráf L., Kenessey A.* FEBS Lett., **69**, 255—260 (1976).
20. *Guillemin R., Ling N., Burgus R.* C. r. hébd. Séances Acad. Sci. Paris D., **274**, 783—785 (1976).
21. *Hambrook J. M., Morgan B. A.. Rance J. M., Smith C. F. C.* Nature (Lond.), **262**, 782—783 (1976).
22. *Henderson G., Hughes J.* Brit. J. Pharmacol., **57**, 551—557 (1976).
23. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neuroscience Lett., **5**, 25—30 (1977).
24. *Hökfelt T., Ljungdahl A., Elde R., Nilsson G., Terenius L.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **74**, 3081—3085 (1977).
25. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
26. *Hughes J., Kosterlitz H. W.* Brit. Med. Bull., **33**, 157—161 (1977).
27. *Hughes J., Kosterlitz H. W., Leslie F. M.* Brit. J. Pharmacol., **53**, 371—381 (1975).
28. *Hughes J., Kosterlitz H. W., Smith T. W.* Brit. J. **Pharmacol. (1977). In press.**
29. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, Lond., **258**, 577—579 (1975).
30. *Jacquet Y. F., Marks N.* Science, N. Y., **194**, 632—635 (1976).
31. *Jessel T. M., Iversen L. L.* Nature, Lond., **268**, 549—551 (1977).
32. *Kosterlitz H. W., Hughes J.* Life Sci., **17**, 91—96 (1975).
33. *Kosterlitz H. W., Hughes J.* In: Research Advances in Alcohol and Drug Problems, Vol. 4, Plenum Press, New York (1977). In press.

34. *Kosterlitz H. W., Waterfield A. A.* Annu. Rev. Pharmacol., **15**, 29—47 (1975).
35. *Kosterlitz H. W., Watt A. J.* Brit. J. Pharmacol., **33**, 266—276 (1968).
36. *Krieger D. T., Liotta A., Suda T., Palkvits M., Brownstein M. J.* Biochem. biophys. Res. Commun (1977). In press.
37. *Kuhar M. J., Pert C. B., Snyder S. H.* Nature, Lond., **245**, 447—450 (1973).
38. *Lampert A., Nirenberg M., Klee W. A.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 3165—3167 (1976).
39. *Li C. H., Chung D.* Nature, Lond., **260**, 622—629 (1976).
40. *Loh H. H., Tseng L. F., Wei E., Li C. H.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 2895—2898 (1976).
41. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, Lond., **267**, 495—499 (1977).
42. *Meek J. L., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 151—154 (1977).
43. *Oliverio A., Castellano C.* Psychopharmacologia, **39**, 13—22 (1974).
44. *Paton W. D. M.* Brit. J. Pharmacol., **12**, 119—127 (1957).
45. *Pert A.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 87—94, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
46. *Pert A., Sivit C.* Nature, Lond., **265**, 645—647 (1977).
47. *Pert C. B., Aposhian D., Snyder S. H.* Brain Res., **75**, 356—361 (1974).
48. *Pert C. B., Bowie D. L., Fong B. T. W., Chang J.-K.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 79—86, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
49. *Pert C. B., Snyder S. H.* Science, N. Y., **179**, 1011—1014 (1973).
50. *Puig M. M., Gascón P., Craviso G. L., Musacchio J. M.* Science N. Y., **195**, 419—420 (1977).
51. *Schulz R., Wüster M., Simantov R., Snyder S. H., Herz A.* Eur. J. Pharmacol., **41**, 347—348 (1977).
52. *Sharma S. K., Klee W. A., Nirenberg M.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **72**, 3092—3096 (1975)
53. *Simantov R., Kuhar M. J., Snyder S. H.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **74**, 2167—2171 (1977).
54. *Simantov R., Snyder S. H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 41—48, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
55. *Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **70**, 1947—1949 (1973).
56. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
57. *Terenius L.* Acta pharmacol. toxicol., **33**, 377—384 (1973).
58. *Terenius L., Wahlström A., Lindström L., Widerlöw E.* Neuroscience Lett., **3**, 157—162 (1976).
59. *Terenius L.* Neurosci. Res. Prog. Bull., **13**, 39—42 (1975).
60. *Trendelenburg P.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **81**, 55—129 (1917).
61. *Tseng L.-F., Loh H. H., Li C. H.* Proc. Natn. Acad. Sci., USA, **73**, 4187—4189 (1976).
62. *Tseng L. F., Loh H. H., Li C. H.* Biochem. biophys. Res. Commun, **74**, 390—396 (1977).
63. *Wahlström A., Brandt M., Moroder L., Wünsch E., Lindeberg G., Ragnarsson U., Terenius L., Hamprecht B.* FEBS Lett., 28—32 (1977).
64. *Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, Lond., **260**, 624—625 (1976).
65. *Waterfield A. A., Kosterlitz H. W.* Life Sci., **16**, 1787—1792 (1975).
66. *Waterfield A. A., Smokcum R. W. J., Hughes J., Kosterlitz H. W., Henderson G.* Eur. J. Pharmacol., 43, 107—116 (1977).
67. *Wei E., Loh H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 303—310, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
68. *Zieglgänsberger W., Fry J. P., Herz A., Moroder L., Wünsch E.* Brain Res.. **115**, 160—164 (1976).

ИНАКТИВАЦИЯ ЭНКЕФАЛИНОВ. ВЛИЯНИЕ ОЧИЩЕННЫХ ПЕПТИДИЛДИПЕПТИДАЗ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Е. Ж. ЭРДОС, А. Р. ДЖОНСОН, Н. Т. БОЙДЕН

(E. G. Erdös, A. R. Johnson, N. T. Boyden)

Быстрое ферментативное расщепление энкефалинов, наблюдаемое многими исследователями [2, 3, 7, 8, 13], представляет собой главную проблему, возникающую при изучении их действия. Четыре пептидные связи в энкефалинах могут расщепляться различными пептидазами. Учитывая важное значение этих процессов инактивации, мы исследовали их, используя в качестве источников ферментов растущие в культуре клетки эндотелия и очищенную пептидазу почек.

Пептидазы эндотелиальных клеток сосудов могут гидролизовать приносимые с кровью пептиды. В недавно опубликованных работах мы описали метаболизм вазоактивных пептидов, таких, как брадикинин, ангиотензины I и II и вещество P в клетках сосудистого эндотелия человека, растущих в культуре ткани [5, 6]. Два из ферментов культивируемых клеток эндотелия человека идентифицированы как аминопептидаза и пептидилдипептидаза [5, 6]. Эти два фермента могут играть важную роль, метаболизируя как гипотензивные, так и гипертензивные пептиды. Аминопептидаза может гидролизовать ангиотензин I или II, отщепляя N-концевую аспарагиновую кислоту. Пептидилдипептидаза отщепляет дипептиды с С-концевого участка брадикинина и ангиотензина I, и при этом ангиотензин I превращается в ангиотензин II, а брадикинин инактивируется [1, 14]. Помимо эндотелиальных клеток пептидилдипептидаза присутствует в других типах клеток, в почках и различных участках центральной нервной системы [11, 15]. Структура энкефалинов такова, что эта кининаза II, или ангиотензин I-превращающий фермент (К. Ф. 3.4.15.1), может их расщеплять. В связи с этим мы исследовали действие очищенной пептидилдипептидазы и культивируемых клеток эндотелия человека на синтетические лей- и мет-энкефалины.

Материал и методы

Лей-энкефалин (Tyr^1-Gly^2-Gly^3-Phe^4-Leu^5; лей-энк) и мет-энкефалин (Tyr^1-Gly^2-Gly^3-Phe^4-Met^5; мет-энк) — препараты, имеющиеся в продаже. Клетки эндотелия из пупочной вены человека выращивали в однослойной культуре, как описано ранее [5]. Пептидилдипептидазу очищали до гомогенного состояния методом Ошима и др. [10]. Лейцинаминопептидаза (К.Ф.3.4.1.1) была получена от фирмы Boehringer Gmbh. Лей-энкефалин (0,25 мкмоль) инкубировали с 1,2 мкг пептидилдипептидазы или 0,12 мкг аминопептидазы при 37 °C в течение 60 мин в 0,06 M NH_4HCO_3-буфере, pH 7,4. Молярное отношение пептидилдипептидазы к субстрату составляло 1 : 30 000. Культивируемые клетки эндотелия человека осторожно соскребали со стекла резиновым шпателем. Клетки затем суспендировали и использовали в концентрации 1 млн. клеток в 1 мл. Продукты гидролиза энкефалинов определяли тонкослойной хроматографией (ТСХ).

Для ТСХ лей-энкефалина и мет-энкефалина использовали соответственно пластинки с силикагелем и с окисью алюминия. В первом случае разделение проводили в системе вторичный бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 5 : 1), а во втором случае использовали систему хлороформ : метанол : NH_4OH (20 : 20 : 9).

Продукты расщепления лей-энкефалина клетками эндотелия или аминопептидазой разделили на пластинках с силикагелем.

Скорость расщепления мет-энкефалина пептидилдипептидазой определяли в аминокислотном анализаторе с программным устройством, разделяя Tyr-Gly-Gly и Phe-Met на колонке длиной 5,5 см в 0,2 н. цитратном буфере, pH 4,25. Колонку калибровали синтетическими трипептидами и дипептидами. Субстрат (0,2 мкмоль/мл) и фермент (2,4 мкг/мл) инкубировали при 37 °C, pH 7,4 в 0,1 M трисе, содержащем 0,1 M NaCl. В контроле расщепление энкефалинов полностью блокировали одним из специфических ингибиторов фермента, либо 10^{-4} M нонапептидом SQ 20881, либо 10^{-6} M SQ 14225 (2-D-метил-3-меркаптопропаноил-L-пролин) [9].

Результаты и обсуждение

И лей-энкефалин, и мет-энкефалин расщепляются пептидилдипептидазой по связи Gly^3-Phe^4 с образованием фрагментов Tyr^1-Gly^2-Gly^3 и Phe^4-Leu^5 или Phe^4-Met^5. На рис. 1 показана пептидная связь, расщепляемая в мет-энкефалине очищенным ферментом.

Скорость гидролиза мет-энкефалина определяли с помощью аминокислотного анализатора. Фермент и субстрат инкубировали в буфере, более благоприятствующем действию фермента, чем буфер, использованный при анализе ТСХ. Вместо NH_4CO_3-буфера инкубационная среда содержала 0,1 M NaCl в трис-буфере, поскольку фермент расщепляет большинство субстратов быстрее в присутствии ионов Cl^- [1]. Пептидилдипептидаза расщепляет мет-энкефалин со скоростью 4,2 мкмоль/мин на 1 мг белка, причем ее

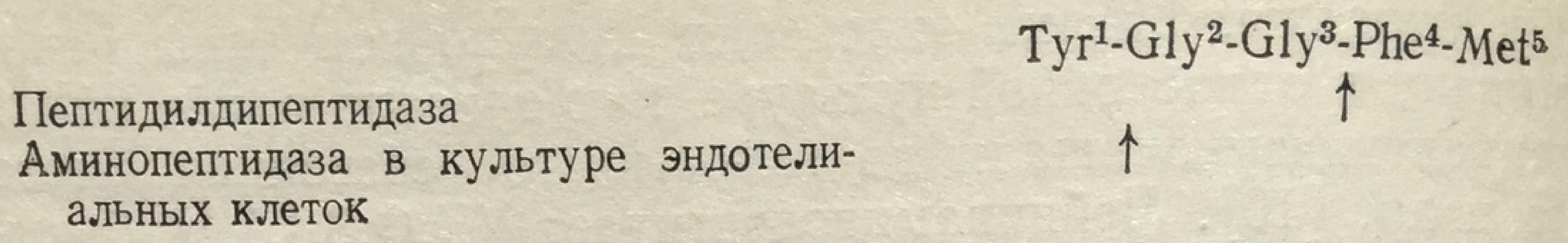


Рис. 1. Пептидные связи мет-энкефалина, расщепляемые пептидилдипептидазой и аминопептидазой.

активность полностью подавляется SQ 20881. Тот же самый препарат фермента расщепляет специфический субстрат Benz-Gly-Gly-Gly (10^{-3} M) со скоростью 7,4 мкмоль/мин (скорость гидролиза определяли с помощью ультрафиолетового спектрофотометра) [10].

Поскольку культивируемые клетки эндотелия содержат как аминопептидазу, так и ферменты типа пептидилдипептидазы, то мы использовали ТСХ, чтобы выяснить, какой из концов (N или C) энкефалина гидролизуется в первую очередь ферментами этих клеток (рис. 1). Связь Try^1-Gly^2 гидролизуется аминопептидазой эндотелия в первую очередь. Активность фермента подавляется секвестрирующим агентом — *о*-фенантролином (10^{-3} M). В контрольных опытах использовали высокоочищенный имеющийся в продаже препарат лейцинаминопептидазы, который также расщеплял пентапептид до тирозина (Tyr^1) и тетрапептида. Отщепление дипептида Phe-Leu под действием эндотелиальной пептидилдипептидазы наблюдалось только после инкубации в течение 60 мин или более.

Проведенные эксперименты показали, что очищенная пептидилдипептидаза расщепляет энкефалины до три- и дипептидов. Образующийся при этом незащищенный трипептид может быть устойчив к дальнейшему расщеплению ферментом из-за наличия свободной α-NH_2-группы.

Пептидилдипептидаза концентрируется в различных частях тела, например в эндотелии сосудов легких и других органов, в почках, в семенниках, в гипофизе. В центральной нервной системе фермент присутствует в таких структурах, как хороидное сплетение [4], хвостатое ядро [11] и полосатое тело [15].

Скорость расщепления мет-энкефалина пептидилдипептидазой весьма ощутима: в условиях нашего эксперимента она менее чем в два раза ниже скорости гидролиза Benz-Gly-Gly-Gly, специфического субстрата этого фермента [1, 14], хотя концентрация энкефалина была в 5 раз ниже, чем концентрация этого оптически активного трипептида.

На рис. 2 представлена схема активного центра пептидилдипептидазы, предложенная Ондетти и др. [9] и вытекающая из исследований карбоксипептидазы A [12]. Показано также предполагаемое расположение лей-энкефалина на поверхности этого фермента. Остаток Leu^5 связывается свободной карбоксильной группой с положительно заряженным участком под действием ионных сил. Вклад связи Phe^4-Leu^5 во взаимодействие с ферментом осуществляется в результате возникновения водородных связей. Связь Gly^3-Phe^4 расщепляется активным центром, содержащим ионы Zn^{2+}. Возможно, что ионы Zn^{2+} могут быть заменены ионами Co^{2+}.

Вследствие субстратной специфичности пептидилдипептидазы [1] фермент этот, по-видимому, не должен расщеплять следующие гипотетические производные энкефалина: 1) производное, в пятом положении которого находится либо аминокислота, не содержащая свободной карбоксильной группы, либо дикарбоновая аминокислота, например глутаминовая, 2) производное, четвертой аминокислотой которого является пролин.

Поскольку только пептиды со свободным С-концом расщепляются пептидилдипептидазой [1], то резистентность к действию фермента может быть одной из причин того факта, что in vivo активность метионинамидного аналога энкефалина [7] значительно превышает активность природного мет-энкефалина. В тканях, в которых концентрируется пептидилдипептидаза, энкефалины могут легко разрушаться этим ферментом. Далее, конкурируя за этот фермент, энкефалины могут изменять метаболизм других активных пептидов и подавлять образование ангиотензина II из ангиотензина I или инактивацию кининов.

Культивируемые клетки эндотелия человека, однако, инактивируют энкефалины в первую очередь под действием аминопептидазы, о чем свидетельствует освобождение остатка Tyr^1. Деградация энкефалинов сходной аминопептидазой обнаружена при использовании либо очищенного фермента [3], либо плазмы, гомогенатов мозга [2, 7] или мембранной фракции мозга крыс [8] в качестве источников фермента.

Наши эксперименты показывают, что быстрая инактивация энкефалинов может быть обусловлена по крайней мере двумя ферментами, присутствующими в тканях. Эти ферменты предположительно локализованы в различных структурах клеток. Пептидилдипептидаза, являющаяся компонентом плазматических мембран

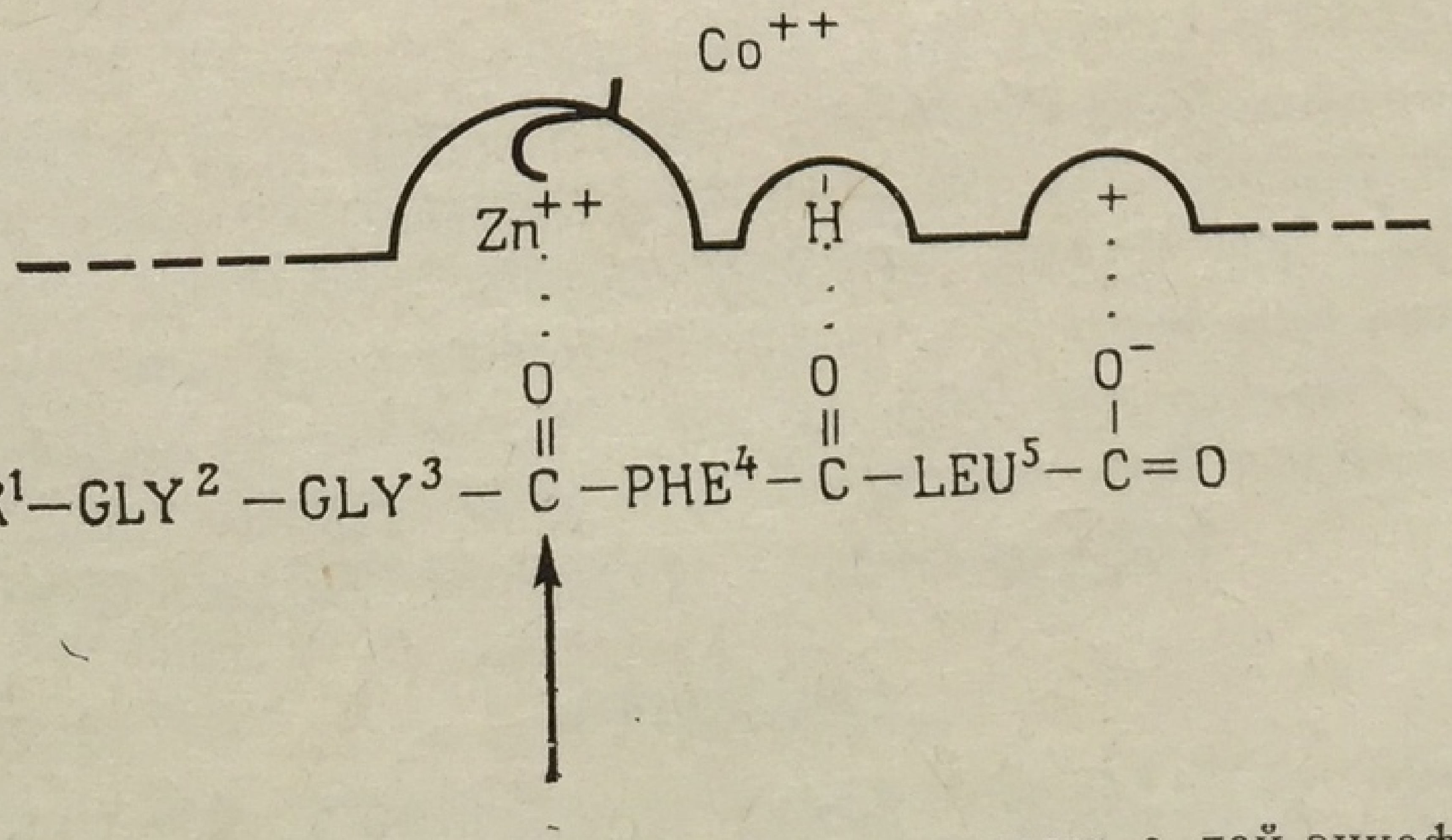


Рис. 2. Показан активный центр пептидилдипептидазы с лей-энкефалином в качестве субстрата [9].

различных клеток [1], может деградировать энкефалины с выделением С-концевого дипептида, а аминопептидаза в клетках эндотелия может расщеплять циркулирующие пептиды с N-конца.

Список литературы

1. *Erdös E. G.* Fed. Proc., **36**, 1760—1768 (1977).
2. *Hambrook J. M., Morgan B. A., Rance N. J., Smith C. F. C.* Nature, **262**, 782—783 (1976).
3. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
4. *Igic R., Robinson C. J. G., Erdös E. G.* In: Symposium on the Central Actions of Angiotensin and Related Hormones, eds. J. P. Buckley and C. M. Ferrario, pp. 23—27, Pergamon Press, New York (1977).
5. *Johnson A. R., Erdös E. G.* J. Clin. Invest., **59**, 684—695 (1977).
6. *Johnson A. R., Erdös E. G.* In: Substance P Nobel Symposium 37, eds. U. S. Euler and B. Pernow, pp. 253—260, Raven Press, New York (1977).
7. *Marks N., Grynbaum A., Neidle A.* Biochem. Biophys. Res. Comm., **74**, 1552—1559 (1977).
8. *Meek J. L., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacol., **16**, 151—154 (1977).
9. *Ondetti M. A., Rubin B., Cushman D. W.* Science, **196**, 441—444 (1977).
10. *Oshima G., Gecse A., Erdös E. G.* Biochim. Biophys. Acta, **350**, 26—37 (1974).
11. *Poth M. M., Heath R. G., Ward M.* J. Neurochem., **25**, 83—85 (1975).
12. *Quiocho F., Lipscomb W. N.* Adv. Protein Chem., **25**, 1—78 (1971).
13. *Snyder S. H., Simantov R.* J. Neurochem., **28**, 13—20 (1977).
14. *Yang H.-Y. T., Erdös E. G., Levin Y.* Biochim. Biophys. Acta, **214**, 374—376 (1970).
15. *Yang H.-Y. T., Neff N. H.* J. Neurochem., **19**, 2443—2450 (1972).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВЫХ НЕЙРОНОВ

О. ЙОХАНСОН, Т. ХЕКФЕЛЬТ, Р. П. ЭЛЬДЕ,
М. ШУЛЬЦБЕРГ, Л. ТЕРЕНИУС

(O. Johansson, T. Hökfelt, R. P. Elde, M. Schultzberg, L. Terenius)

Рецепторы опиатов были выявлены по связыванию радиоактивных лигандов [15, 61, 71, 77] и по результатам радиоавтографического исследования [1, 2, 60]. Оказалось, что они связаны с мембранами нейронов. Рецепторы обладают минимальным сродством к ранее идентифицированным нейромедиаторам (см. обзоры 12, 14, 38, 73, 74, 78). В 1975 году Хьюс и сотр. [39] выделили из центральной нервной системы, охарактеризовали и синтезировали два пентапептида — метионин-энкефалин (мет-энкефалин) и лейцин-энкефалин (лей-энкефалин), различающиеся только по С-концевой аминокислоте. Вместе с другими родственными пептидами они образуют так называемые эндорфины [16, 49] — группу веществ, играющих, по-видимому, роль эндогенных лигандов для опиатных рецепторов [16, 39, 49, 55, 70, 79—81]. Все они являются частями значительно более крупной молекулы, β-липотропина [47]. Региональная локализация энкефалинов в мозгу млекопитающих напоминает локализацию опиатных рецепторов [19, 36, 37, 44, 55, 56, 68, 72, 82]. При субклеточном фракционировании энкефалины обнаруживаются во фракции синаптосом [70]. Для более точного определения распределения и клеточной локализации энкефалинов мы использовали антисыворотку к этим пептидам и к α-эндорфину и непрямой иммунофлуоресцентный метод Кунса и сотр. [8].

Предварительные результаты иммуногистохимических исследований были уже опубликованы [11, 20, 21, 23, 34, 35], а в настоящей работе будет проведен краткий обзор этих исследований. Распределение энкефалинов в центральной нервной системе крысы исследовали также Симантов и сотр. [69]. Кроме того, Блюм и др. [6] обнаружили в мозгу нейроны, дающие при иммунологическом анализе положительную реакцию на β-эндорфин.

Методы

Антитела к мет-энкефалину и лей-энкефалину получали, как описано ранее [11, 23] (а также статья, готовая к печати). Специфичность атисыворотки оценивали в тесте на конкурентное подавление связывания. Антисыворотка к лей-энкефалину, использованная в нашей ранней работе [11], перекрестно реагировала с мет-энкефалином на 20%, тогда как полученная впоследствии антисыворотка к мет-энкефалину обладала 10%-ной перекрестной реактивностью к лей-энкефалину и менее чем 0,1%-ной реактивностью к α-, β- и γ-эндорфинам, веществу Р и соматостатину. Недавно были получены антисыворотки, более специфичные к мет- и лей-энкефалинам соответственно. Однако в задачу настоящего исследования не входят попытки дифференцировать мет- и лей-энкефалины. Отметим, что все результаты, о которых пойдет речь далее, получены с помощью антисыворотки к мет-энкефалину, поскольку известно, что содержание мет-энкефалина в мозгу крыс втрое превышает содержание лей-энкефалина [72]. Поскольку нельзя исключить перекрестной реактивности с неизвестными пептидами и белками, химический состав которых сходен с энкефалинами, наиболее подходящим термином нам представляется энкефалиноподобная иммунореактивность (ЭПИ).

Для иммуногистохимического анализа использовалась антисыворотка в разведении 1 : 10—1 : 160. Для контроля специфичности иммунологической реакции срезы инкубировали с антисывороткой, блокированной энкефалином в концентрации 50 мкг на 1 мл сыворотки, разведенной в соотношении 1 : 10. Для второго этапа инкубации использовали флуоресцеинизотиоцианат, конъюгированный с овечьими антителами соответственно к иммуноглобулинам кролика или морской свинки; разведение антител составляло 1:4 (Statens Bakteriologiska Laboratorium, SBL, Stockholm, Sweden). Все препараты сыворотки содержали 0,3% тритона X-100 [17].

Самцов крыс-альбиносов (вес тела 150—200 г) или морских
свинок (вес тела 300 г) перфузировали через восходящую аорту
охлажденным до температуры таяния льда 4%-ным раствором
параформальдегида, приготовленным по Пизу [58], и некоторые
ткани, включая головной и спинной мозг, тщательно промывали
физологическим раствором на фосфатном буфере и получали сре-
зы тканей на криостате Дитте (Ditte, Heidelberg, G. F. R.). Даль-
нейшую обработку срезов проводили по методу Кунса и сотр.
[8], как подробно описано в предшествующих публикациях [27,
28]. Кратко: срезы инкубировали во влажной атмосфере в течение
30 мин со специфической антисывороткой и затем после промыва-
ния физиологическим буферным раствором инкубировали в тех же
условиях с флуоресцеинизотиоцианатом, конъюгированным с ан-
тителами. В других случаях инкубацию проводили при 4 °С в те-
чение ночи. После инкубации срезы промывали, монтировали на
предметные стекла и затем исследовали и фотографировали в
флуоресцентном микроскопе Zeiss Junior, снабженном темно-
полным масляным конденсором. Анатомическую номенклатуру
приводили в соответствие с атласами Кенига и Клиппеля [42],
Якобовитса и Палковитса [40] и Палковитса и Якобовитса [54].

Результаты

До сего времени ЭПИ обнаружена только в нейронных элементах. Локализация ЭПИ в центральной нервной системе исследована только у крыс, а локализация ЭПИ в периферической нервной системе — как у крыс, так и у морских свинок. В серийных срезах, инкубированных с антисывороткой, блокированной энкефалином, флуоресцентные структуры не обнаруживаются, что указывает на специфичность иммунологической реакции.

ЦЕНТРАЛЬНАЯ НЕРВНАЯ СИСТЕМА

ЭПИ присутствует в телах нейронов и нервных терминалях в обширных участках головного и спинного мозга. Идентификация энкефалин-положительных тел нейронов оказалась довольно трудным делом, что явилось не очень большой неожиданностью, поскольку во многих предшествующих исследованиях аналогичные трудности возникали при изучении других пептидов. Так, Барри и сотр. [4] смогли визуализировать содержащие люлиберин тела нейронов только после определенных экспериментальных воздействий, а во многих других лабораториях вначале вообще не удавалось выявить люлиберин-положительные тела нейронов [3, 29, 41, 67]. После внутрижелудочковой инъекции колхицина энкефалин-положительные тела нейронов выявляются во многих участках головного и спинного мозга. Колхицин использовался во многих предшествующих исследованиях для увеличения содержания в теле нейронов предполагаемых нейромедиаторов [10], ферментов [43] и пептидов [4, 33]. Колхицин, как принято считать, останавливает аксонный (и интрасомный) транспорт благодаря своему действию на микротрубочки [66]. Поскольку на процессы синтеза такая обработка не влияет, происходит накопление образующихся веществ в телах нейронов.

Группы клеток

Иммунореактивные группы клеток обнаруживаются в хвостатом ядре (рис. 1,*А*), в каудальной вентромедиальной части латерального ядра перегородки, в nucleus interstitialis striae terminalis (боковая часть), в перивентрикулярном преоптическом ядре, медиальном преоптическом ядре, паравентрикулярном ядре, перифорникальном участке (рис. 1,*Б*), аркуатном ядре, вентромедиальном ядре, дорсальном и вентральном премамиллярных ядрах, простирающихся латерально в медиальный пучок переднего мозга, в периакведуктальном сером веществе среднего мозга (вентролатеральные участки), в некоторых слоях colliculus superior, в определенных участках substantia nigra, в nucleus interpeduncularis, внутри наружной петли, в вентральном и дорсальном парабрахиальных ядрах, в медиальном вестибулярном ядре, в ядре большого шва, простирающегося латерально над кортикоспинальным трактом (рис. 1,*В*,*Г*), в дорсальном ядре улиткового нерва, в вентромедиальной части гигантоклеточного ретикулярного ядра и в участках, расположенных вентрально от этого ядра, в nucleus tractus solitarii, в ядре бледного шва, в парамедианном ретикулярном ядре, в маргинальном слое ядра спинального тракта тройничного нерва, в желатинозном веществе (substantia gelatinosa) тройничного нерва и в заднем роге спинного мозга (рис. 2). Общее число участков, содержащих энкефалин-положительные тела клеток, к настоящему времени превышает 25. α-Эндорфин-иммунореактивные тела клеток обнаружены к настоящему времени в вентральном премамиллярном ядре (рис. 3). Некоторые клетки простираются также в аркуатное ядро и в ряде случаев во внутренний слой срединного возвышения и латерально вдоль поверхности мозга.

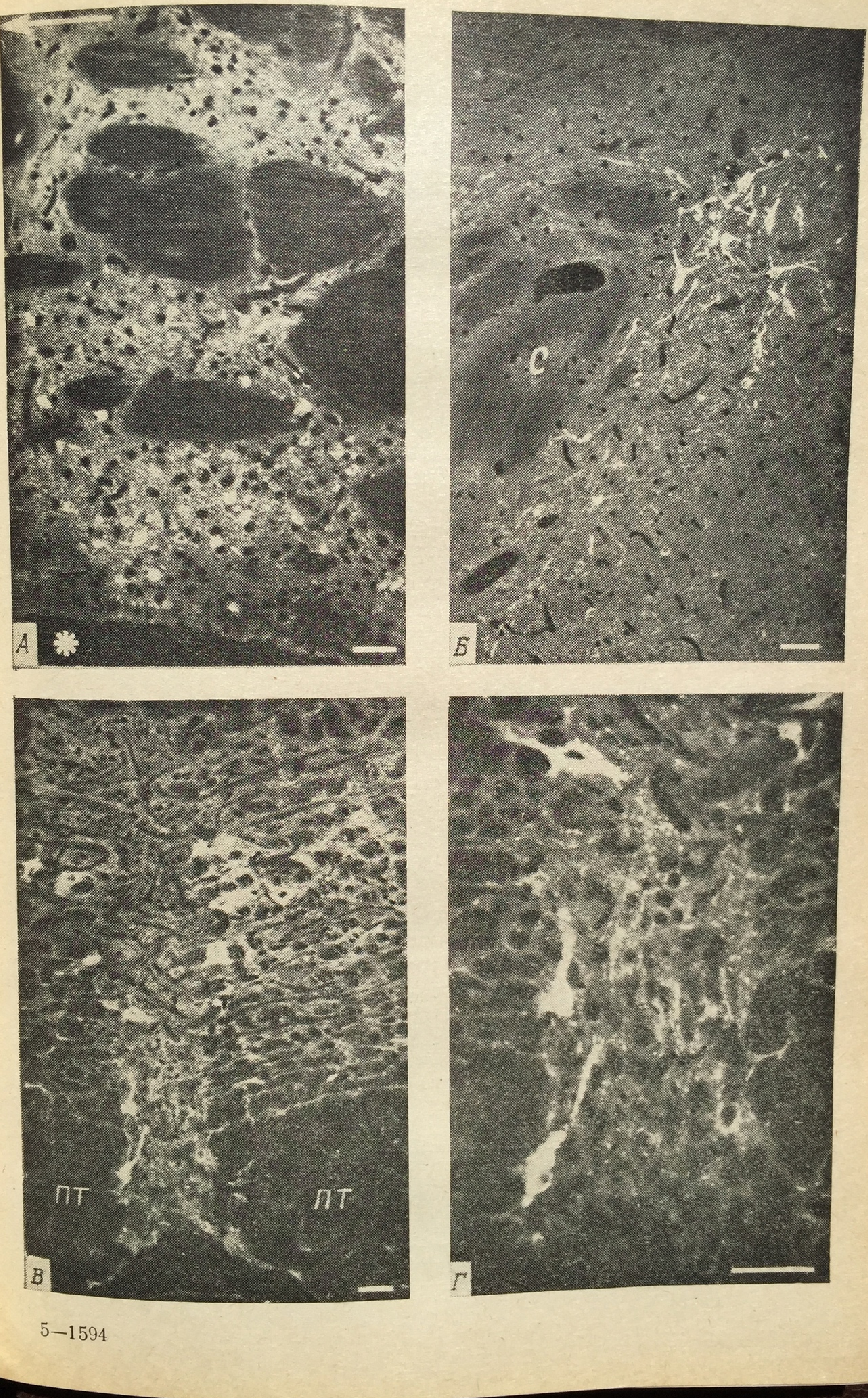
Нервные терминали

Здесь приведено только краткое описание участков с относительно высокими плотностями. (Подробное описание можно найти в работах [5, 6, 11, 20, 21, 34, 35, 69].) Результаты более детального картирования будут опубликованы впоследствии.

В *телэнцефалоне* очень плотная иннервация была обнаружена в бледном шаре (рис. 4,*А*,*Б*). Среди других участков с обильной иннервацией отмечены латеральное ядро перегородки (рис. 4,*В*), nucleus interstitialis striae terminalis, аккумбентное ядро (рис. 4,*Г*), центральное миндалевидное ядро (рис. 5,*А*) и хвостатое ядро (рис. 5,*Б*). Кроме того, хорошо выраженная иннервация обнаруживается в участках комплекса гиппокампа.

В *диэнцефалоне* бóльшая часть гипоталамических ядер содержит волокна с ЭПИ, особенно вентромедиальное и дорсомедиальное ядра (рис. 5,*В*), перивентрикулярная область и медиальное преоптическое ядро. Медиальная часть внешнего слоя срединного возвышения (рис. 5,*Г*) характеризуется умеренной плотностью ЭПИ-содержащих волокон. ЭПИ-положительные волокна обнару-

Рис. 1. Иммунофлуоресцентные микрофотографии хвостатого ядра (*А*), перифорникальной области (*Б*) и nucleus raphe magnus продолговатого мозга (*В* — *Г*), получавших колхицин крыс. Ткани предварительно инкубировали с антисывороткой к мет-энкефалину. Многочисленные флуоресцирующие тела клеток видны в хвостатом ядре (*А*) вблизи желудочка (звездочка), вокруг свода (с) (*Б*), а также в nucleus raphe magnus (*В* и *Г*). Обратите внимание на энкефалин-положительные нервные терминали в последней области (*В*). *Г* — более сильное увеличение. *В*. *ПТ* — пирамидальный тракт. Стрелкой на *А* показано дорсальное направление. *Б* — *Г* взяты из работы [23]. Отрезок прямой на этих и всех следующих микрофотографиях соответствует 50 мкм.


А
*
Б
С
ПТ
ПТ
В
Г

живаются также в интраламинарном ядре таламуса и в некоторых участках вентрального таламического ядра.

В *мезэнцефалоне* флуоресцирующие волокна обнаруживаются в периакведуктальном сером веществе и в zona compacta substantia nigra.

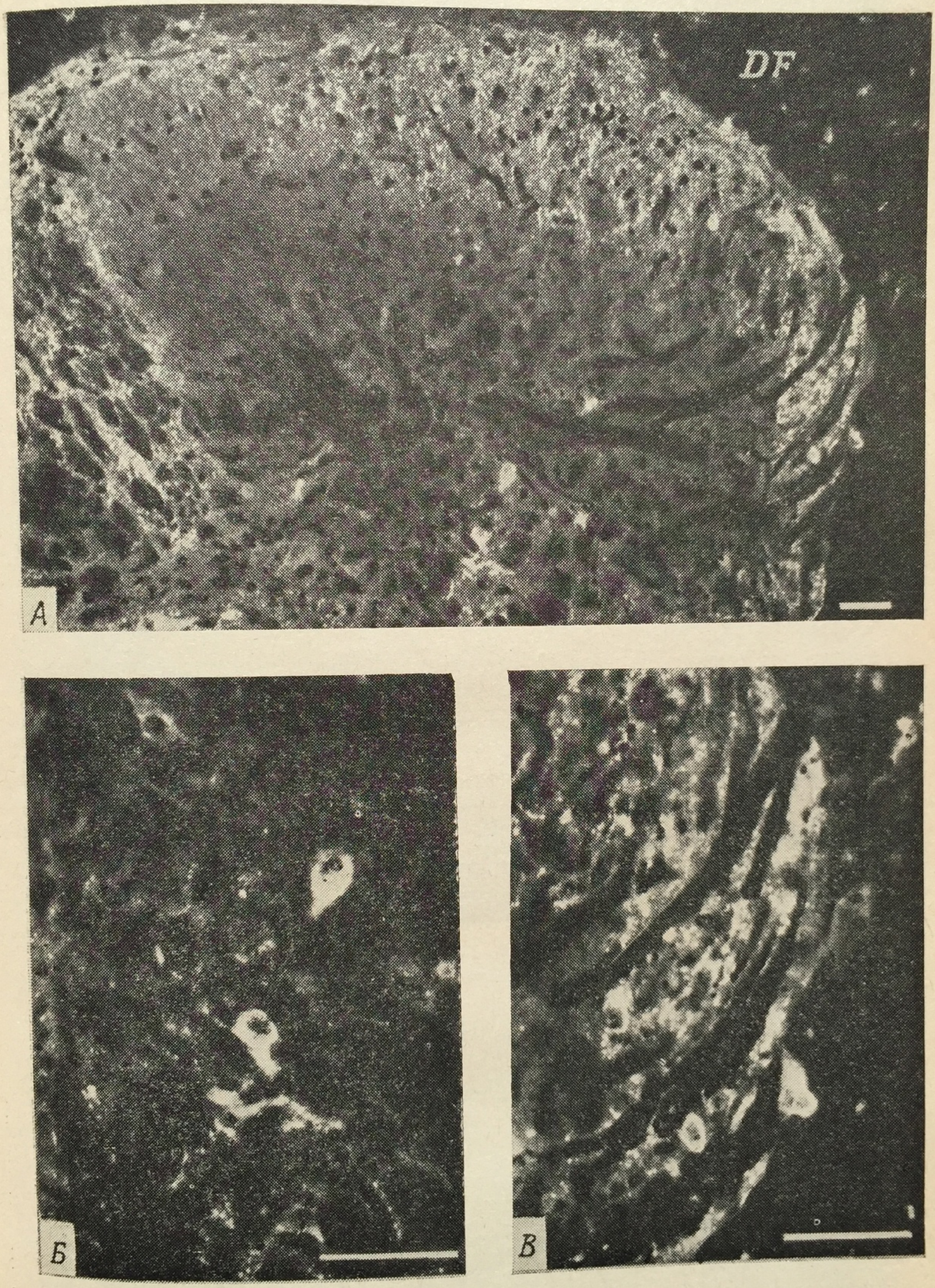
В *варолиевом мосте* плотная сеть флуоресцирующих волокон обнаруживается в дорсальном парабрахиальном ядре (рис. 6, *А*). Средняя плотность ЭПИ-содержащих волокон обнаружена в периакведуктальном центральном сером веществе и в locus coeruleus.

В *продолговатом мозгу* наиболее высокое количество флуоресцирующих волокон обнаруживается в маргинальной пластинке и желатинозном веществе ядра спинального тракта тройничного нерва, в латеральном ретикулярном ядре, в nucleus ambiguus, nucleus tractus solitaris, nucleus originis nervi facialis, nucleus originis nervi hypoglossi и в комиссуральном ядре (рис. 6, *Б*).

На всех уровнях *спинного мозга* обнаруживается интенсивная сеть ЭПИ-положительных волокон. Наиболее высокая плотность обнаружена в слоях I, II (рис. 6, *В*), V и VII [63, 75], а также в участках, расположенных вокруг центрального канала. Другие участки серого вещества также содержат энкефалин-положительные волокна, но с меньшей плотностью. Многочисленные энкефалин-положительные волокна видны также в дорсомедиальной части бокового канатика, вблизи заднего рога.

Было проведено предварительное изучение распределения α-эндорфин-положительных нервных терминалей. Умеренно плотная сеть обнаружена в некоторых ядрах гипоталамуса, особенно в дорсомедиальном ядре (рис. 6, *Г*). Кроме того, многочисленные флуоресцирующие волокна содержатся в медиальном преоптическом, паравентрикулярном и перивентрикулярном ядрах, а также в перифорникальном участке. Рассеянные эндорфин-положительные волокна обнаруживаются в большинстве участков гипоталамуса. Вне гипоталамуса тесное сплетение эндорфин-положительных волокон обнаруживается в перивентрикулярном ядре таламуса. Положительные волокна видны также в области миндалевидного ядра, в nucleus interstitialis striae terminalis, распространяющемся дорсально в базальную часть латерального ядра перегородки, и в центральном периакведуктальном сером веществе. Не обнаружили положительных волокон в нижнем стволе мозга и в спинном мозгу.

Рис. 2. *А* — *В*. Иммунофлуоресцентные микрофотографии заднего рога спинного мозга получавших колхицин крыс [34]. Ткани предварительно инкубировали с антисывороткой к метионин-энкефалину. Энкефалин-положительные тела нейронов обнаружены в глубинных (*Б*) и более поверхностных пластинках (*В*). *Б* и *В* — более сильное увеличение клеток, представленных на *А*. DF — dorsal funiculus (задний канатик).


DF
А
Б
В

ПЕРИФЕРИЧЕСКАЯ НЕРВНАЯ СИСТЕМА

Как правило, у морских свинок наблюдаются более выраженные и более многочисленные энкефалин-положительные волокна, чем у крыс.

В *желудочно-кишечном тракте* флуоресцирующие волокна обнаруживаются главным образом во внутреннем кольцевом мышечном слое и в ауэрбаховом сплетении (рис. 7, *А*). В частности у морских свинок волокна видны также в мышечном слое слизистой оболочки желудка. В стенках желудочно-кишечного тракта ЭПИ-положительные тела клеток не выявляются, но в опытах с культурой ткани выявлено существование ЭПИ-положительных нейронов в кишечнике (Шульцберг, Дрейфус, Гершон и Хёкельт, в печати).

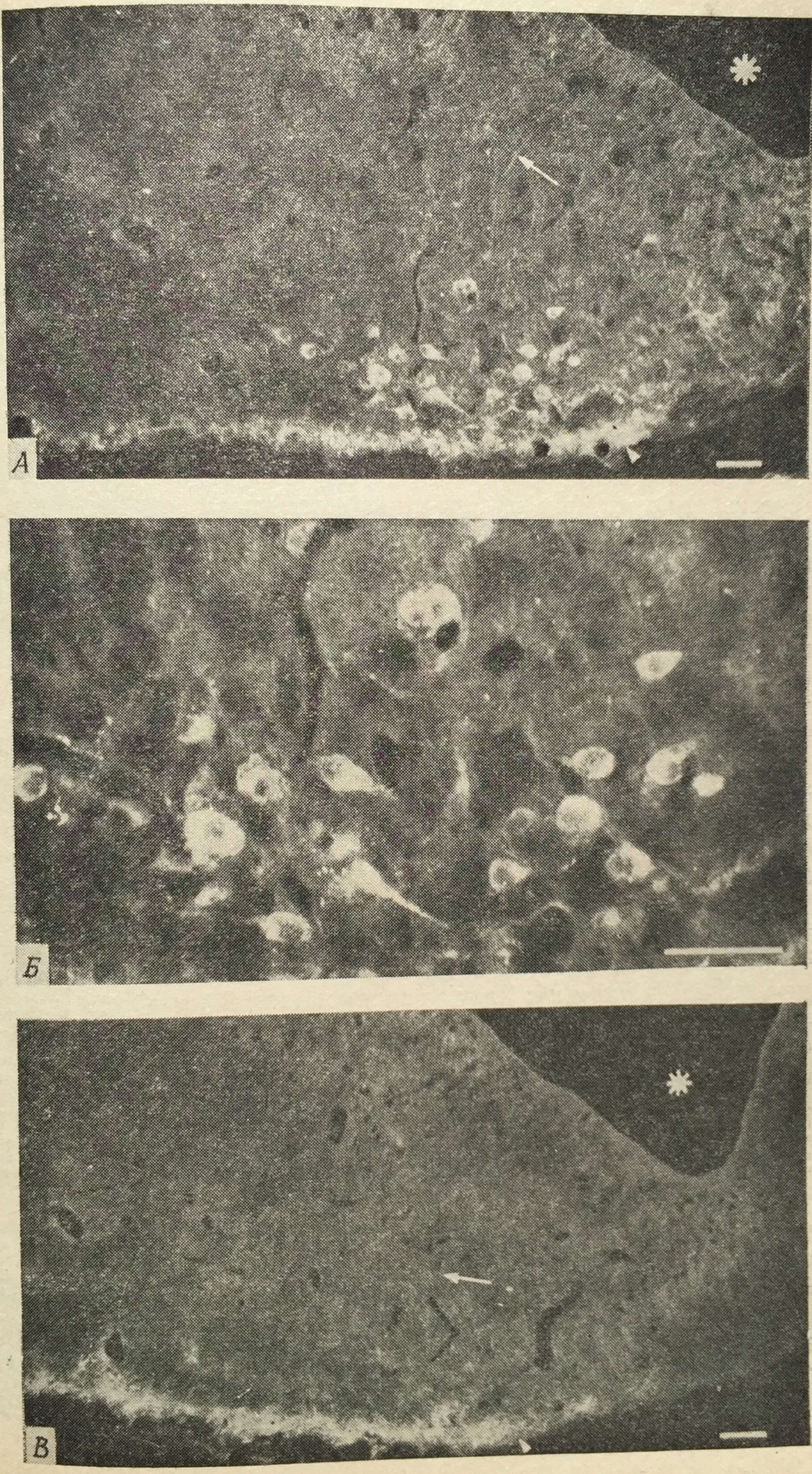
Некоторые *симпатические ганглии,* и особенно превертебральный ганглий морской свинки, содержат энкефалин-положительные нервные терминали. Плотная иннервация флуоресцирующими нервными терминалями наблюдается в нижнем брыжеечном ганглии вокруг собственно ганглионарных клеток (рис. 7,*Б*,*В*) и менее плотная — вокруг мелких, интенсивно флуоресцирующих (МИФ) клеток. Комплекс чревного и верхнего брыжеечного ганглиев и гипогастральный ганглий содержат более редкую сеть флуоресцирующих волокон. Только отдельные флуоресцирующие волокна наблюдаются в верхнем шейном ганглии.

В некоторой степени ЭПИ наблюдается также в волокнах мелких ганглиев, в ряде *других периферических тканей,* в том числе в мочевом тракте и вблизи щитовидной железы.

Заключение

Приведенные здесь данные указывают на существование большого числа систем нейронов в головном и спинном мозгу и на периферии, взаимодействующих с антителами к энкефалинам. Предварительные исследования, проведенные в нашей лаборатории с антителами к α-эндорфину, указывают на гораздо более

Рис. 3. Иммунофлуоресцентные микрофотографии базального гипоталамуса крыс, получавших колхицин. Ткани предварительно инкубировали с антителами к α-эндорфину (*А* — *Б*) или контрольной сывороткой (*В*). Различные флуоресцирующие тела нейронов видны в вентральном премаммилярном ядре. *Б* — более сильное увеличение рис. *А*. Обратите внимание на отсутствие эндорфин-положительных тел нейронов в контрольных срезах. Однако слабо флуоресцирующие волокна (стрелка), простирающиеся от желудочка (звездочка) в вентральном направлении, равно как и флуоресцентная зона вдоль базальной поверхности мозга (кончик стрелки), видны после инкубации как со специфической (*А*), так и с контрольной (*В*) сывороткой и, следовательно, отражают неспецифическое окрашивание.


A
Б
В

ограниченное распространение данного пептида, что подтверждает результаты исследований Блюма и др. [6], использовавших антитела к β-эндорфину. Поскольку α-эндорфин-положительные тела нейронов не идентичны никаким из энкефалин-положительных групп клеток, обнаруженных к настоящему времени [23], кажется вероятным, что эти два опиоидных пептида содержатся в различных системах нейронов.

Интересно отметить, что более ранние иммуногистохимические исследования с использованием антител к другим пептидам, таким, как вещество Р[32], люлиберин [3, 4, 29, 41, 59, 67] или тиролиберин [30, 31], показали, что их распределение уникально для каждого пептида [20, 21] и явно отличается от распределения энкефалинов, описанного в настоящей статье. Наблюдаемое в наших исследованиях распределение ЭПИ не может быть обусловлено присутствием в тканях эндорфинов, поскольку соответствующие антитела не обладают сколько-либо заметной перекрестной реактивностью с этими веществами. Это подтверждается также тем фактом, что не обнаружено положительной иммунофлуоресценции в промежуточной доле гипофиза, которая, как известно, богата эндорфинами [5] (см. также [65]).

Обнаруженные энкефалин-положительные тела нейронов составляют, как правило, лишь малую долю всех тел нейронов в различных ядрах мозга. К настоящему времени не обнаружено мет-энкефалин-иммунореактивных тел нейронов или нервных терминалей в коре мозга и мозжечка. Вполне возможно, что существуют и другие системы, содержащие энкефалины, но концентрация пептидов в них слишком мала, чтобы их можно было обнаружить доступными нам методами.

Широкое распространение энкефалиновых нейронов свидетельствует об их участии во многих аспектах функционирования мозга. Интересно однако, отметить, что энкефалиновые нейроны присутствуют в участках мозга, предположительно имеющих отношение к боли и анальгезии [50, 51, 53, 64]. Эти участки включают в себя центральное периакведуктальное серое вещество, ядро медуллярного шва, спинальное ядро тройничного нерва и спинной мозг. Особый интерес вызывает обильная иннервация слоев I и II заднего рога и маргинальной пластинки и желатинозного вещества ядра спинального тракта тройничного нерва. Эти волокна, по всей

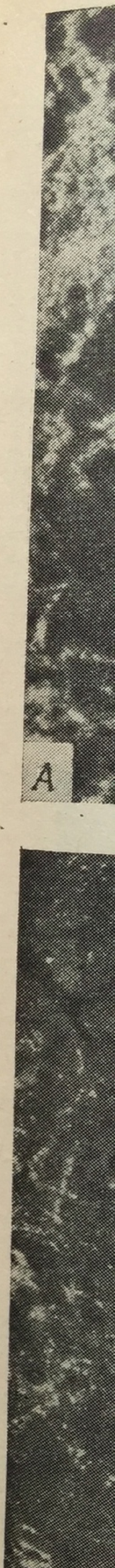
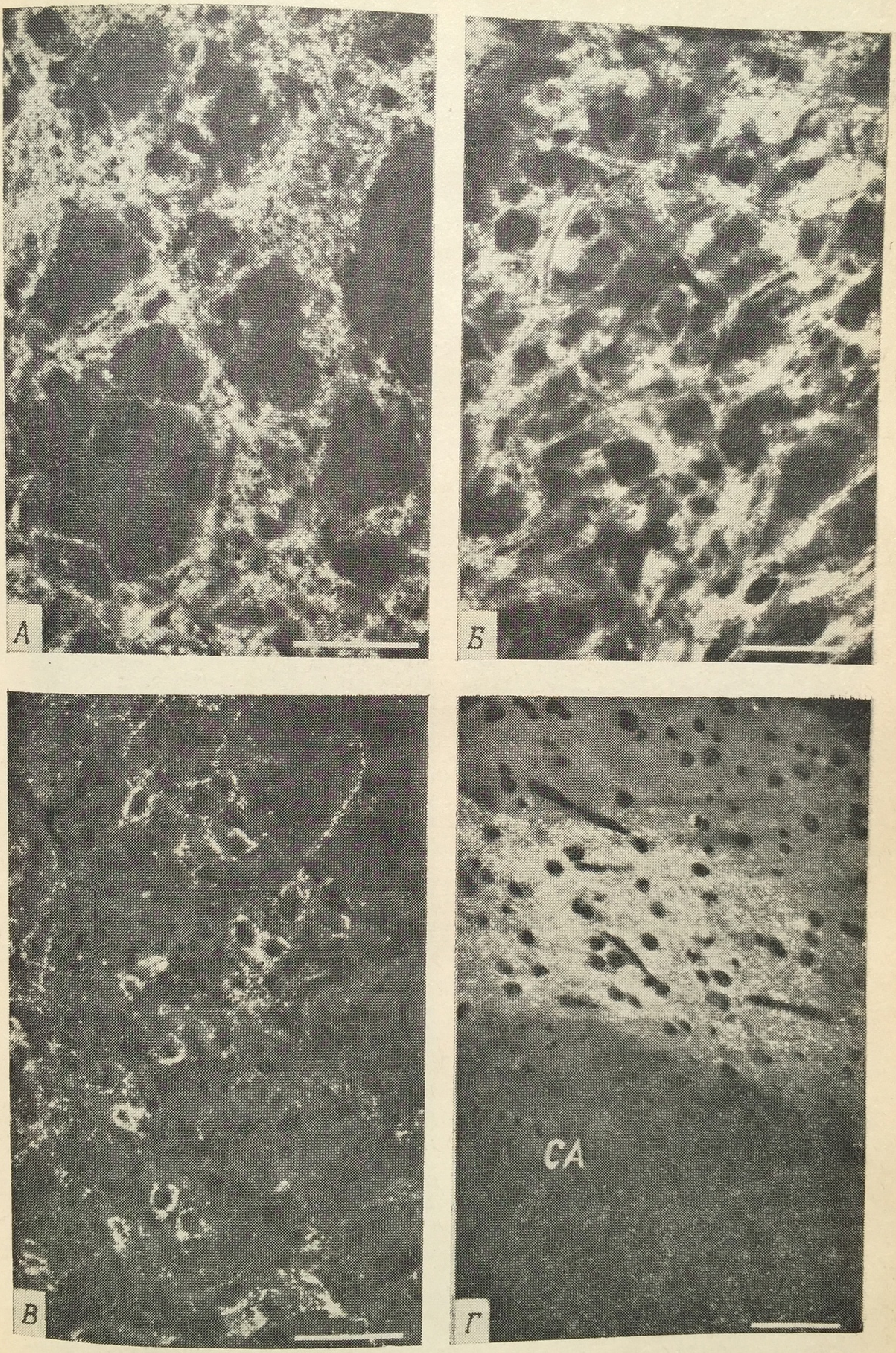


Рис. 4. Иммунофлуоресцентные микрофотографии бледного шара (*А — Б*), латерального ядра перегородки (*В*) и аккумбентного ядра (*Г*) после инкубации с антисывороткой к мет-энкефалину. Бледный шар содержит особенно плотную сеть энкефалин-положительных терминалей (*А, Б*). Обратите внимание на расположенные в виде корзинок энкефалин-положительные терминали в латеральном ядре перегородки (*В*) и пятнистое распределение тонких флуоресцирующих нервных терминалей в аккумбентном ядре. CA — commissura anterior. Рис. *А* и Г взяты из работы [11].


А
Б
В
CA
Г

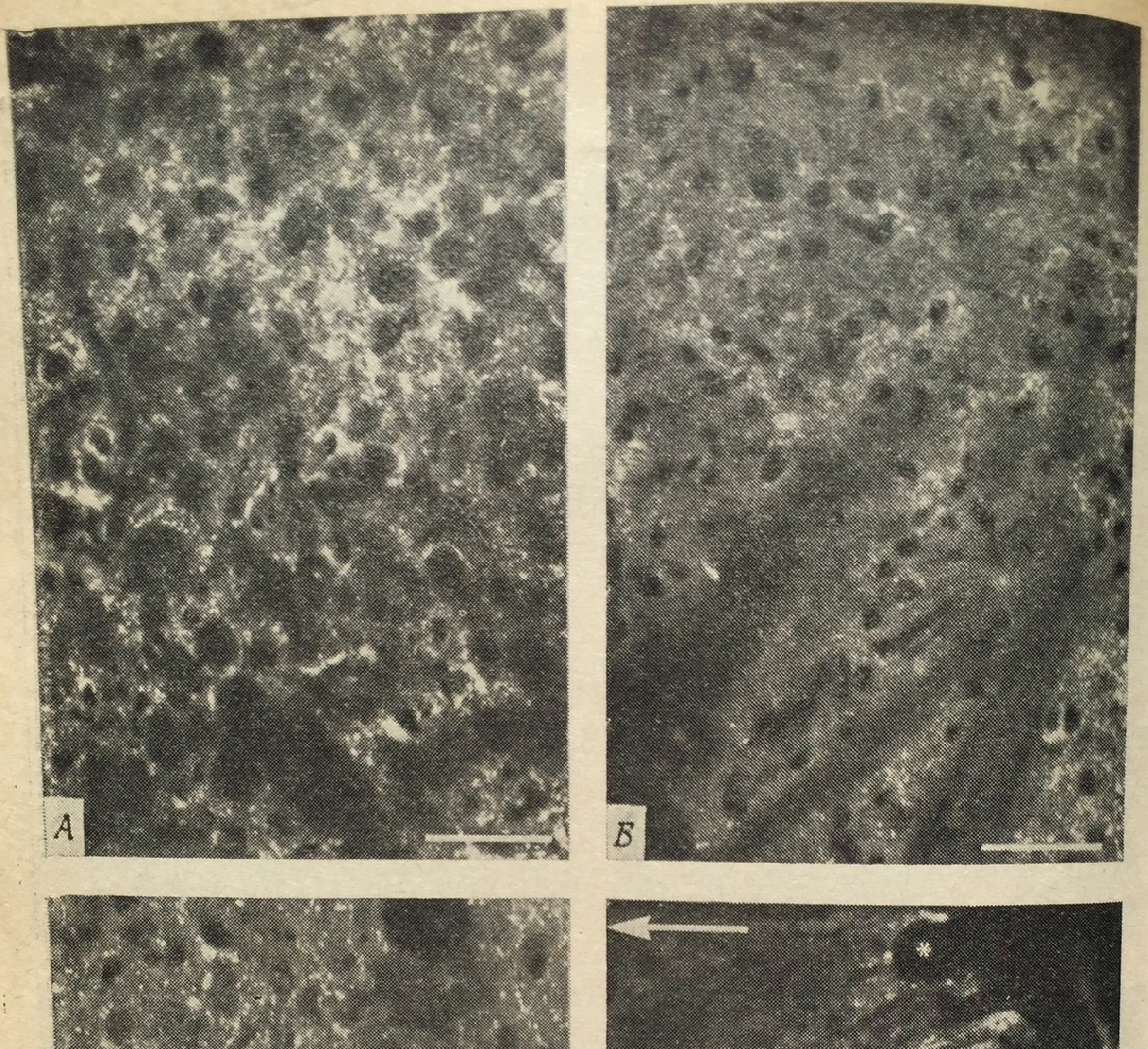


Рис. 5. Иммунофлуоресцентные микрофотографии центрального миндалевидного ядра (*А*), хвостатого ядра (*Б*), дорсомедиального гипоталамического ядра (*В*) и срединного возвышения (*Г*) после инкубации с антисывороткой к мет-энкефалину. В этих участках видна различная плотность энкефалин-положительных терминалей. В срединном возвышении они обнаруживатся главным образом во внешнем слое вокруг капиллярных петель (звездочки). Стрелкой на рис. *Г* показано дорсальное направление.

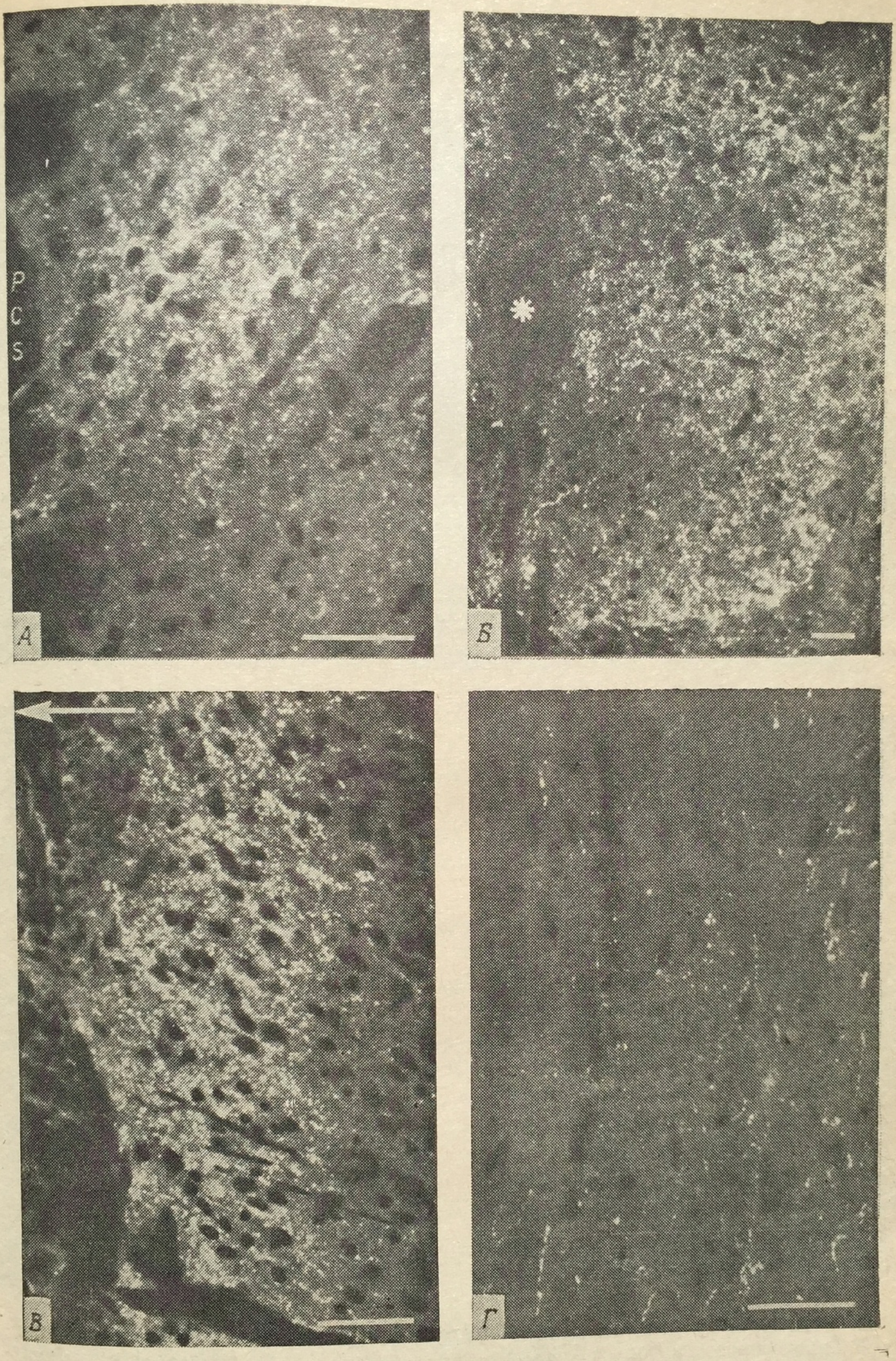


Рис. 6. Иммунофлуоресцентные микрофотографии nucleus parobrachialis dorsalis (*А*), nucleus commissuralis, nucleus intercalatus и nucleus hypoglossus (*Б*), поверхностной пластины заднего рога спинного мозга (*В*) и дорсомедиального гипоталамического ядра (*Г*) после инкубации с антисыворотками против мет-энкефалина (*А—В*) или α-эндорфина (*Г*). На рис *А—В* видны плотные сети энкефалин-положительных волокон, тогда как дорсомедиальное ядро содержит редкое сплетение α-эндорфин-положительных волокон (*Г*). PCS — pedunculus cerebellaris superior. Звездочкой на рис. *Б* показан центральный канал. Стрелкой на рис. *В* показано дорсальное направление. Рис. *А* взят из работы [11].

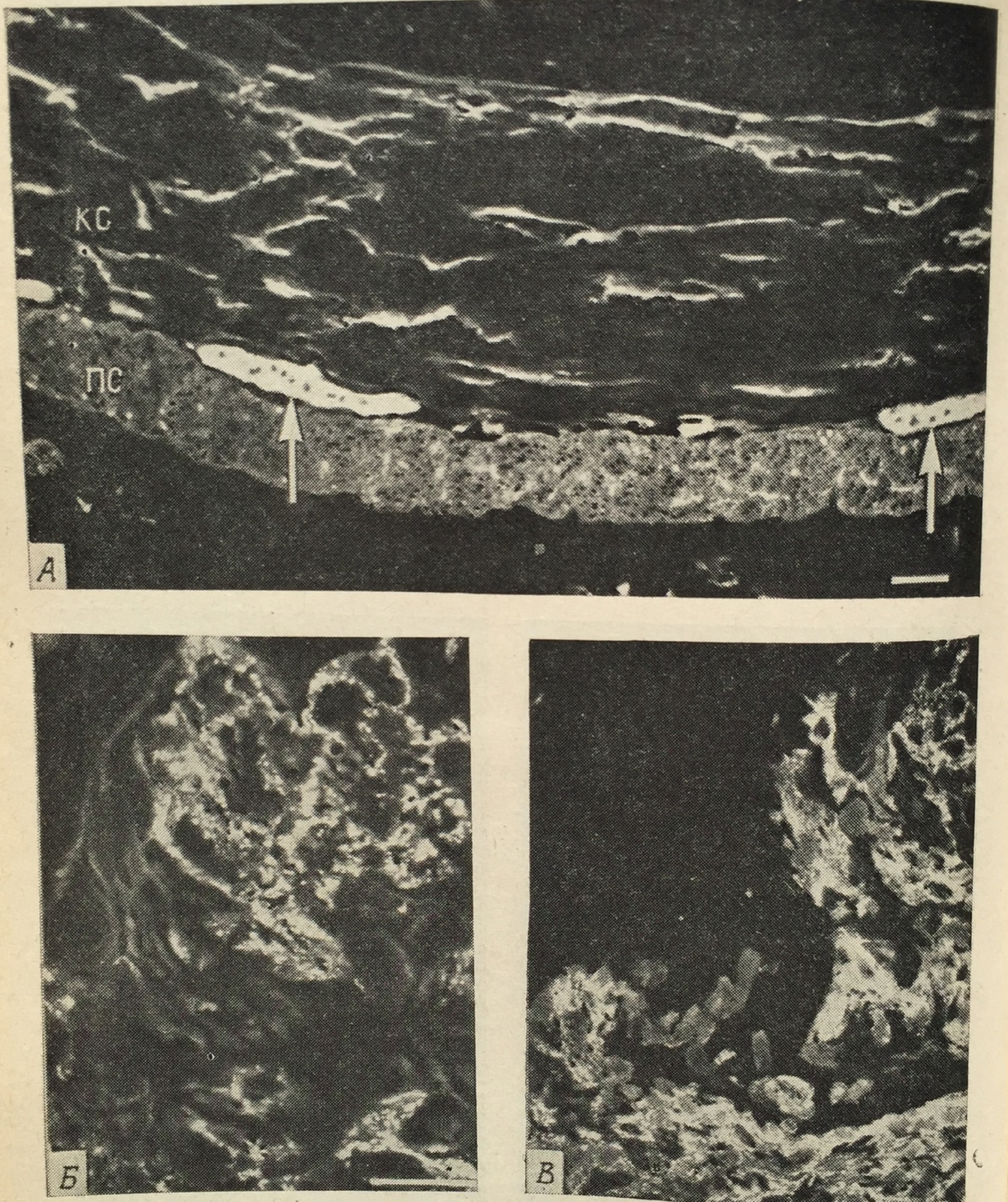


Рис. 7. Иммунофлуоресцентные микрофотографии толстого кишечника (*А*) и нижнего брыжеечного ганглия (*Б, В*) морских свинок. Ткани предварительно инкубировали с антисывороткой к мет-энкефалину. Многочисленные волокна видны в ауэрбаховом сплетении (стрелки) и в мышечных слоях, особенно в нижнем кольцевом слое (КС); ПС — продольный слой мышечной оболочки. Плотное сплетение энкефалин-положительных волокон представлено также в нижнем брыжеечном ганглии (*Б — В*).

вероятности, относятся к энкефалиновым интернейронам (или, возможно, проприоспинальным нейронам), которые, по мнению Ламотт и др. [45], могут образовывать аксон-аксоновые синапсы с передающими болевые импульсы первичными афферентами. Интересно отметить, что существует значительное перекрывание между этими энкефалин-положительными нервными терминалями, с одной стороны, и содержащими вещество Р первичными афферентами, с другой стороны. На основе результатов морфологических наблюдений [32] и нейрофизиологических экспериментов [18, 62] было высказано предположение, что первичные афферентные нейроны, содержащие вещество Р, могут передавать болевые импульсы. Энкефалины, выделяющиеся из этих терминалей, могут индуцировать анальгезию, стимулируя пресинаптические опиатные рецепторы [34], локализованные на содержащих вещество Р первичных афферентах. Действительно, Куелло и др. [9] недавно показали, что энкефалины могут подавлять выделение вещества Р из ядра спинального тракта тройничного нерва in vitro.

Можно привести еще один пример участия энкефалинов в частной функции мозга. Недавно было показано, что энкефалин способен вызывать выброс пролактина [48]. Эти наблюдения можно объяснить существованием многочисленных энкефалиновых нервных окончаний во внешнем слое срединного возвышения [20]. Они могут доходить сюда от одной из нескольких групп энкефалин-иммунореактивных тел нейронов в гипоталамусе; в этом случае туберо-инфундибулярная [76] энкефалиновая система может быть вовлечена в гипоталамический контроль секреции гормонов гипофиза.

Распределение энкефалиновых нейронов в периферической нервной системе свидетельствует о том, что эта автономная система устроена, по-видимому, значительно сложнее, чем мы ранее предполагали. Это подтверждается существованием периферических нейронов, содержащих вещество Р [26, 32, 52, 57], вазоактивный кишечный полипептид [7, 13, 25, 46] и соматостатин [22, 24]. Точная функциональная роль этих периферических пептидсодержащих нейронов в настоящее время неясна.

* * *

Авторы благодарят за квалифицированную техническую помощь миссис Хайарт, мисс Норелл, мисс Персон и миссис Този-Нигардс.

Список литературы

1. *Atweh S. F., Kuhar M. J.* Brain Res., **129**, 1—12 (1977).
2. *Atweh S. F., Kuhar M. J.* Brain Res. (1977). In press.
3. *Baker B. L., Dermody W. C., Reel Jr.* Am. J. Anat., **139**, 129—134 (1974).
4. *Barry J., Dubois M. P., Poulain P.* Z. Zellforsch., **146**, 351—366 (1973).

5. *Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N., Leppaluoto J., Vargo T. M., Guillemin R.* Life Sci., **20**, 43—48 (1977).
6. *Bloom F., Rossier J., Battenberg E., Vargo T., Minick S., Ling N., Guillemin R.* Neurosci. Abst. (1977). In press.
7. *Bryant M. G., Polak J. M., Modlin I., Bloom S. R., Albuquerque R. H., Pearse A. G. E.* Lancet, **1**, 991—993 (1976).
8. *Coons A. H.* In: General Cytochemical Methods, ed. J. F. Danielli, pp. 399—422, Academic Press, New York (1958).
9. *Cuello A. C., Emson P., del Fiacco M., Gale J., Iversen L. L., Jessell T. M., Kanazawa I., Paxinos G., Quik M.* In: Centrally Acting Peptides, ed. J. Hughes, Macmillan, London (1977). In press.
10. *Dahlström A.* In: New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines, eds. H. J. Schümann and G. Kroneberg, pp. 20—26, Bayer Symposium II, Springer, Berlin (1970).
11. *Elde R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—355 (1976).
12. *Frederickson R. C. A.* Life Sci. (1977). In press.
13. *Fuxe K., Hökfelt T., Said S. I., Mutt V.* Neurosci. Letters (1977). In press.
14. *Goldstein A.* Science, **193**, 1081—1086 (1976).
15. *Goldstein A., Lowney L. I., Pal B. K.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **68**, 1742—1747 (1971).
16. *Guillemin R., Ling N., Burgus R.* C. R. Acad. Sci. (Paris), D, **282**, 783—785 (1976).
17. *Hartman B. K., Zide D., Udenfriend S.* Proc. Natn. Acad. Sci. (Wash.), **69**, 2722—2726 (1972).
18. *Henry J. L.* Brain Res., **114**, 439—451 (1976).
19. *Hiller J. M., Pearson J., Simon E. J.* Res. Comm. chem. Path. Pharmacol., **6**, 1052—1062 (1973).
20. *Hökfelt T., Elde R., Fuxe K., Johansson O., Ljungdahl A., Goldstein M., Luft R., Efendić S., Nilsson G., Terenius L., Ganten D., Jeffcoate S. L., Rehfeld J., Said S., Perez de la Mora M., Possani L., Tapia R., Teran L., Palacios R.* In: The Hypothalamus, eds. S. Reichlin and R. Baldessarini, Raven Press, New York (1977). In press.
21. *Hökfelt T., Elde R. P., Johansson O., Ljungdahl A., Schultzberg M., Goldstein M., Nilsson G., Pernow B., Terenius L., Ganten D., Jeffcoate S. L., Rehfeld J., Said S.* In: Psychopharmacology: A Generation of Progress, eds. M. A. Lipton, A. DiMascio and K. F. Killam, Raven Press, New York (1977). In press.
22. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Luft R., Nilsson G., Arimura A.* Neuroscience, **1**, 131—136 (1976).
23. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neurosci. Letters, **5**, 25—31 (1977).
24. *Hökfelt T., Elfvin L. G., Elde R., Schultzberg M., Luft R.* Proc. Natn. Acad. Sci. (1977). In press.
25. *Hökfelt T., Elfvin L. G., Schultzberg M., Fuxe K., Said S., Mutt V., Goldstein M.* Neuroscience (1977). In press.
26. *Hökfelt T., Elfvin L. G., Schultzberg M., Goldstein M., Nilsson G.* Brain Res., **132**, 29—41 (1977).
27. *Hökfelt T., Fuxe K., Goldstein M.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **254**, 407—432 (1975).
28. *Hökfelt T., Fuxe K., Goldstein M., Joh T. J.* Histochemistry, **33**, 231—254 (1973).
29. *Hökfelt T., Fuxe K., Goldstein M., Johansson O., Fraser H., Jeffcoate S. L.* In: Anatomical Neuroendocrinology, eds. W. E. Stumpf and L. D. Grant, pp. 381—392, Karger, Basel (1975).
30. *Hökfelt T., Fuxe K., Johansson O., Jeffcoate S. L., White N.* Neurosci. Letters, **1**, 133—139 (1975).
31. *Hökfelt T., Fuxe K., Johansson O., Jeffcoate S. L., White N.* Europ. J. Pharmacol., **34**, 389—392 (1975).

32. *Hökfelt T., Johansson O., Kellerth J.-O., Ljungdahl A., Nilsson G., Nygårds A., Pernow B.* In: Substance P. Nobel Symposium, eds. U. S. von Euler and B. Pernow, pp. 117—145, Raven Press, New York (1977).
33. *Hökfelt T., Kellerth J.-O., Nilsson G., Pernow B.* Brain Res., **100**, 235—252 (1975).
34. *Hökfelt T., Ljungdahl A., Elde R., Nilsson G., Terenius L.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **74**, 3081—3085 (1977).
35. *Hökfelt T., Terenius L., Elfvin L. G., Schultzberg M., Elde R., Goldstein M.* Neuroscience (1977). In press.
36. *Hong J. S., Yang H.-Y., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 451—453 (1977).
37. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 1—14 (1975).
38. *Hughes J., Kosterlitz H. W.* Brit. Med. Bull., **33**, 157—161 (1977).
39. *Hughes J., Smith T., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—579 (1975).
40. *Jacobowitz D. M., Palkovits M.* J. Comp. Neurol., **157**, 13—28 (1974).
41. *King J. C., Parsons J. A., Erlandsen S. L., Williams T. H.* Cell Tissue Res., **153**, 211—218 (1974).
42. *König J. F. R., Klippel R. A.* The Rat Brain, Williams and Wilkins, Baltimore (1963).
43. *Kreutzberg G.* Proc. Natn. Acad. Sci. (Wash.), **62**, 722—728 (1969).
44. *Kuhar M. J., Pert C. B., Snyder S. H.* Nature, Lond., **245**, 447—450 (1973).
45. *Lamotte C., Pert C. B., Snyder S. H.* Brain Res., **112**, 407—412 (1976).
46. *Larsson L.-I., Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O., Sundler F., Håkanson R., Rehfeld J. F.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 3197—3200 (1976).
47. *Li C. H., Chung D.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 1145—1148 (1976).
48. *Lien E. L., Fenschel R. L., Garsky V., Sarantakis D., Grant N. H.* Life Sci., **19**, 837—840 (1976).
49. *Ling N., Burgus R., Guillemin R.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 3942—3946 (1976).
50. *Mayer D., Price D.* Pain, **2**, 379—404 (1976).
51. *Mayer D. J., Wolfle T. L., Akil H., Carder B., Liebeskind J. C.* Science, **174**, 1351—1354 (1971).
52. *Nilsson G., Larsson L.-I., Håkanson R., Brodin E., Sundler F., Pernow B.* Histochemistry, **43**, 97—99.
53. *Oliveras J. L., Besson J. M., Guilbaud G., Liebeskind J. C.* Exp. Brain Res., **20**, 32—44 (1974).
54. *Palkovits M., Jacobowitz D. M.* J. Comp. Neurol., **157**, 29—42 (1974).
55. *Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).
56. *Pasternak G. W., Simantov R., Snyder S. H.* Mol. Pharmacol., **12**, 504—513 (1976).
57. *Pearse A. G. E., Polak J.* Histochemistry, **41**, 373—375 (1975).
58. *Pease D. C.* Anat. Res., **142**, 342 (1962).
59. *Pelletier G., Leclerc R., Dubé D.* J. Histochem. Cytochem., **24**, 864—871 (1976).
60. *Pert C. B., Kuhar M. J.. Snyder S. H.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **73**, 3724—3733 (1976).
61. *Pert C. B., Snyder S. H.* Science, **179**, 1011—1014 (1973).
62. *Randić M., Miletic V.* Brain Res., **128**, 164—169 (1977).
63. *Rexed B.* J. Comp. Neurol., **100**, 297—379 (1954).
64. *Reynolds D. V.* Science, **164**, 444—445 (1969).
65. *Ross M., Ehrenkranz J., Cox B. M., Goldstein A.* Fed. Proc., **35**, 844 (1976).
66. *Schmitt F. O.*, Neurosci. Res. Progr. Bull., **6**, 119—144 (1968).
67. *Sétalo G., Vigh S., Schally A. V., Arimura A., Flerko B.* Endocrinology, **96**, 135—142 (1975).
68. *Simantov R., Kuhar M. J., Pasternak G. W., Snyder S. H.* Brain Res., **106**, 189—197 (1975).
69. *Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder S. H.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **74**, 2167—2171 (1977).
70. *Simantov R., Snowman A. M., Snyder S. H.*, Brain Res., **107**, 650—657 (1976).

71. *Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I.* Proc. Natn. Acad. Sci. USA, **70**, 1947—1949 (1973).
72. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Endogenous Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, North-Holland, Amsterdam (1977).
73. *Snyder S. H.* Sci. Am., **236**, 44—56 (1977).
74. *Snyder S. H., Simantov R.* J. Neurochem., **28**, 13—20 (1977).
75. *Steiner T. J., Turner L. M.* J. Physiol. (Lond.), **222**, 123—125P (1972).
76. *Szentagothai J., Flerkó B., Mess B., Halász B.* Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary, Akademia Kiadó, Budapest (1962).
77. *Terenius L.* Acta pharmac. tox., **32**, 317—320 (1973).
78. *Terenius L.* Ann. Rev. Pharmacol. (1978). In press.
79. *Terenius L., Wahlström A.* Acta pharmacol. tox. (Kbh), **35**, 55, Suppl. 1 (1974).
80. *Terenius L., Wahlström A.* Acta physiol. scand., **94**, 74—81 (1975).
81. *Teschemacher H., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1771—1776 (1975).
82. *Yang H.-Y., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).

ЭНКЕФАЛИНЫ И НЕЙРОТЕНЗИН. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИГДАЛОФУГАЛЬНОГО ТРАКТА

Дж. ЮЛ, Р. ГУДМЕН, М. КУХАР, С. СНАЙДЕР

(G. R. Uhl, R. R. Goodman, M. Z. Kuhar, S. H. Snyder)

Значительные успехи в выяснении роли пептидов мозга достигнуты благодаря иммуногистохимическому изучению их локализации. В этих исследованиях часто удавалось выявить пептидоподобную иммунореактивность внутри нейронных элементов. Кроме того, изучение регионального картирования обеспечивало увеличивающееся количество деталей, касающихся участков мозга, в которых эти пептиды были, вероятно, биологически активными. Мы использовали специфические антисыворотки к таким пептидам, как лей-энкефалин, мет-энкефалин и нейротензин, хорошо охарактеризованным радиоиммунологическим методом, чтобы составить карту распределения этих пептидов в мозгу.

Опиоидные пентапептиды, мет- и лей-энкефалины [16, 25], проявляют, по-видимому, свои нейромедиаторно- и нейромодуляторноподобные эффекты благодаря взаимодействию с опиатными рецепторами мозга (см. обзор [29]). Радиоавтографическая визуализация распределения опиатных рецепторов [1—3, 22] и изучение определяемой иммуногистохимически локализации энкефалинов ([10, 14, 15, 24], а также Юл и др. в печати) показали, что определяемые системы энкефалинов распределены по многим участкам мозга. В то время как микроскопический анализ флуоресценции энкефалинов дает основание думать, что эти пептиды содержатся внутри нейронных элементов [10, 24], более макроскопическое распределение этой флуоресценции в сочетании с локализацией рецепторов указывает на некоторые возможные локусы, в которых опиаты могут взаимодействовать с подходящими системами мозга в реализации вызываемых ими эффектов, например анальгезии [15, 29].

Нейротензин представляет собой биологически активный тридекапептид, выделенный из гипоталамуса крупного рогатого скота и охарактеризованный Каррауэем и Лименом [5, 6]. Полученные нами данные о наличии специфических рецептороподобных мест связывания нейротензина в мозгу [27, 28, 32] (см. также [17, 19]) и повышенное содержание этого пептида в сером веществе и синаптосомной и микросомной субклеточных фракциях [31] дают основание рассматривать нейротензин как возможный кандидат в нейромедиаторы (нейромодуляторы) мозга [32]. Совсем недавно мы обнаружили нейротензиноподобную иммунофлуоресценцию в телах нервных клеток, в нервных волокнах и терминалях во многих участках мозга [30]. Эти результаты также подтверждают медиаторную роль этого пептида.

Мы приводим здесь результаты изучения нами иммунофлуоресценции энкефалина и нейротензина в мозгу крысы. В первой серии экспериментов мы варьировали продолжительность инкубации и дозу колхицина при предварительной обработке [14], с тем чтобы подобрать оптимальные условия визуализации пептидсодержащих тел нейронов.

Мы приводим также результаты, полученные методом предварительной обработки колхицином при детальном выяснении локализации энкефалин- и нейротензинсодержащих тел нейронов, волокон и терминалей в продолговатом мозгу, варолиевом мосту и среднем мозгу.

И наконец, мы представляем данные, полученные в экспериментах с повреждением волокон и показывающие, что энкефалин- и нейротензинсодержащие тракты проходят рострально через вентролатеральные участки концевой полоски. Концевая полоска содержит главные афферентные проекции миндалевидного ядра, оканчивающиеся в гипоталамическом, преоптическом, обонятельном, септальном и аккумбентном ядрах и в интерстициальном ядре концевой полоски [8, 9]. Этот путь вовлечен в различные физиологические функции, включая нейроэндокринную регуляцию [26], инициацию судорожной активности [11] и определенные варианты агрессивного поведения [20]. Наш интерес к этой системе объясняется тем, что центральное ядро миндалины, вентролатеральный участок концевой полоски и интерстициальное ядро концевой полоски характеризуются высокой плотностью волокновидных и терминалевидных структур, обогащенных энкефалином и нейротензином [10, 24]. Далее, радиоавтографическим анализом выявлена значительная плотность опиатных рецепторов в миндалине и ложевом ядре концевой полоски [3]. На основании изучения анатомической дегенерации Де Олмос [9] пришел к выводу, что боковой отдел вентрального компонента концевой полоски возникает из центрального, латерального и базолатерального миндалевидных ядер с окончаниями «почти исключительно» в латеральном участке ложевого ядра концевой полоски (рис. 1). Мы поставили опыты с повреждением нейронов, с тем чтобы исследовать возможность существования пептидсодержащего тракта в концевой полоске, соединяющего эти два участка.

Локализация тел нейронов, установленная с помощью колхицина, результаты осуществленного нами картирования ствола мозга, а также данные, полученные при изучении повреждений, об-

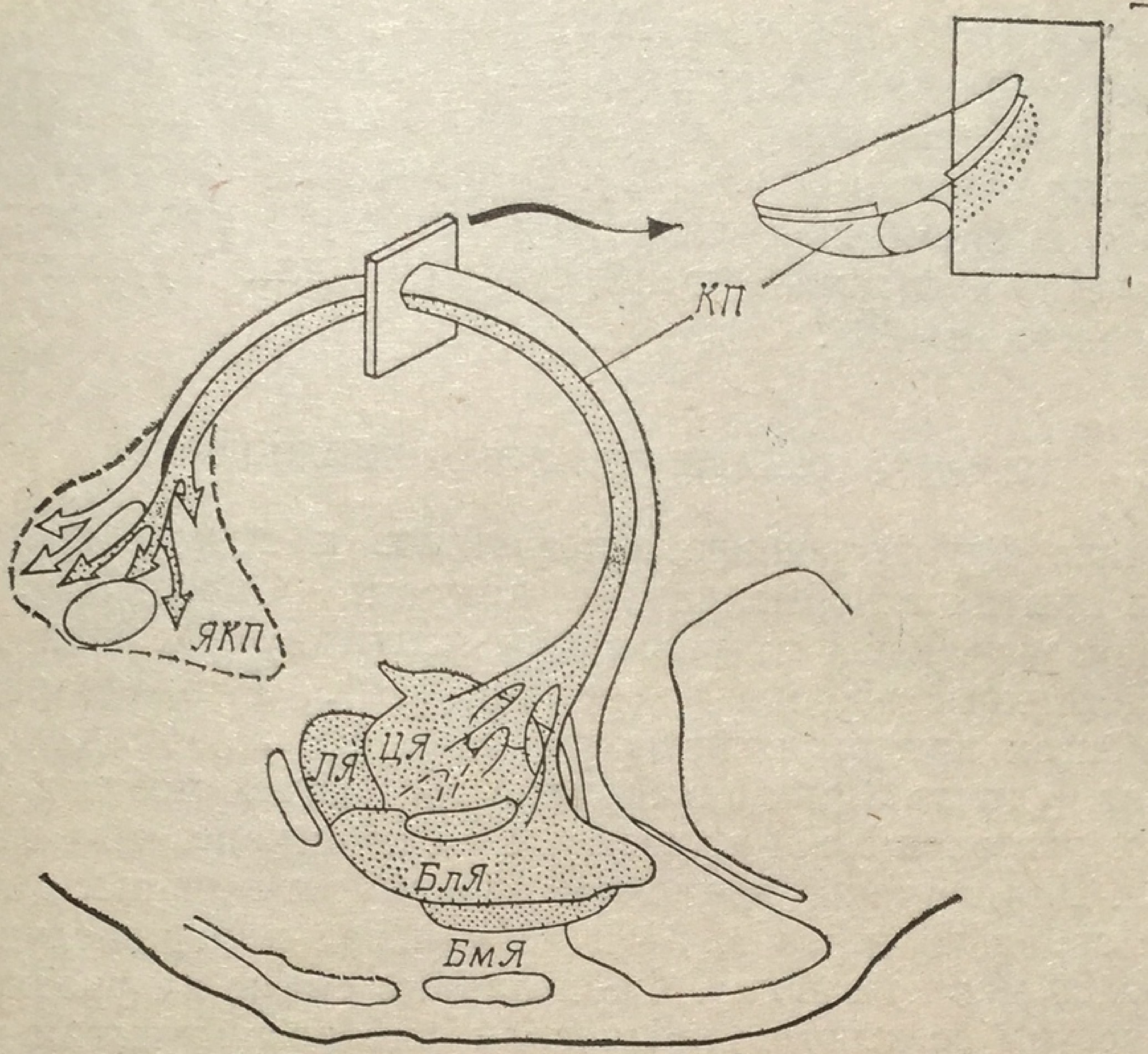


Рис. 1. Начало, путь и окончание волокон, проходящих через вентролатеральную концевую полоску, определяемые классическими методами дегенерации. Волокна, начинающиеся в центральном (ЦЯ), латеральном (ЛЯ), базолатеральном (БлЯ) и базомедиальном (БмЯ) миндалевидных ядрах, проходят через вентролатеральную концевую полоску (КП) и заканчиваются в интерстициальном ядре концевой полоски (ЯКП) [9].

суждаются в свете вопроса: содержатся ли энкефалины первично в интернейронах?

Материалы и методы

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИСЫВОРОТОК

Специфические антисыворотки против мет- и лей-энкефалинов получали от кроликов после серии инъекций конъюгатов энкефалинов и гемоцианина, образованных с помощью глутаральдегида, как описано ранее [7]. Радиоиммунологический анализ этих сывороток выявил пренебрежимо малую перекрестную реактивность с большим количеством пептидов, включая α- и β-эндорфины. Далее, сродство каждой из антисывороток к тому энкефалиновому пентапептиду, против которого она была получена, было в 200 раз выше, чем сродство к другому пентапептиду (Чайлдерс и Снайдер, данный сборник).

Антисыворотка против нейротензина была получена от морских свинок, получавших многократные инъекции конъюгата нейротензина и гемоцианина, образованного с помощью карбодиимида, как было описано ранее [31]. В радиоиммунологическом тесте сродство этой антисыворотки к нейротензину в 1000 раз превышало ее сродство к фрагментам нейротензина или другим исследованным пептидам [30].

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА КОЛХИЦИНОМ

Вначале флуоресценцию энкефалинов и нейротензина исследовали в опытах с нормальными крысами Спрэг-Доули весом 100 г. Для улучшения визуализации пептидсодержащих тел нейронов части крыс вводили колхицин [14]. В предварительных экспериментах крысам инъецировали по 10, 25, 50 или 100 мкг колхицина (фирма Sigma) в боковой желудочек мозга в 0,25 мкл 0,9%-ного раствора NaCl в течение 1—2 мин; через 48 ч животных забивали. Для изучения временно́й зависимости действия колхицина крыс забивали через 4, 24 и 48 ч после внутрижелудочковой инъекции 50 мкг колхицина. Фронтальные срезы на уровне передней комиссуры всех крыс окрашивали флуоресцирующим красителем и затем исследовали иммунофлуоресценцию энкефалинов.

ИЗУЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Электролитическое повреждение миндалевидного ядра проводили с помощью радиочастотного повреждающего устройства Грасса (модель LM4) и электрода из нержавеющей стали, изолированного, за исключением небольшого отрезка (0,5 мм) на конце, несколькими слоями распыленного лака. Ток в 8 мА поступал через этот электрод в течение 30 с в участок со стереотаксическими координатами: вперед 5,5 мм, считая от брегмы; влево 3,7 мм, считая от средней линии; вглубь 7,0 мм, считая от поверхности мягкой оболочки головного мозга. Для операции использовали анестезированных фенобарбиталом крыс весом 150—220 г, помещенных в стандартный стереотаксический прибор (фирмы David Kopf). Выживших крыс забивали через 10 суток и иммунофлуоресценцию энкефалинов и нейротензина изучали на нескольких уровнях.

Перерезку концевой полоски проводили на стереотаксическом приборе — перемещением ножа (N 11) во фронтальной плоскости по участку с координатами 1,5—5 мм сбоку от средней линии на глубине 4,5—5 мм от поверхности мягкой оболочки. Разрезы проводили на расстоянии примерно 3,8—6 мм кпереди от линии ушей. Выживших крыс забивали через 2 и 70 ч после операции и в участках кпереди и кзади от линии перерезки изучали иммунофлуоресценцию энкефалинов и нейротензина. Окрашивание крезиловым фиолетовым через разрезы концевой полоски и повреждения миндалевидного ядра обеспечивало гистологическую реконструкцию степени повреждения.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ

Криостатные срезы толщиной 16 мкм получали из мозга, перфузированного забуференным 4%-ным деполимеризованным параформальдегидом, как было описано ранее [30]. Окрашивание проводили в соответствии с ранее описанным методом [30], используя первичную антиэнкефалиновую сыворотку в разведении 1 : 25, первичную антинейротензиновую сыворотку в разведении 1 : 15—1 : 20 и конъюгированные с флуоресцеином антитела козы к иммуноглобулинам кролика и морской свинки (лаборатория Кэппеля) в разведении 1 : 35—1 : 50. Контролем на неспецифическую флуоресценцию служили соседние срезы, окрашенные первичной антисывороткой, адсорбированной в течение ночи при 4°C 1 мМ лей-энкефалином, 1 мМ мет-энкефалином или 0,1 мМ нейротензином. Были использованы анатомические атласы Кёнига и Клиппеля [18 и Палковитса и Якобвитса [21]; анатомической локализации помогало изучение соседних срезов, окрашенных крезиловым фиолетовым.

Результаты

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОКРАШИВАНИЯ

Специфическая флуоресценция, характерная для мет-энкефалина, лей-энкефалина и нейротензина, наблюдаемая во всех наших исследованиях, подавлялась при предварительной адсорбции сыворотки пептидами, против которых данная сыворотка была получена. Однако предварительная адсорбция другими пептидами не подавляла пептидоподобной флуоресценции [24, 30].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛХИЦИНА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПЕРИКАРИОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДЫ

В наших предварительных экспериментах по установлению зависимости доза — ответ при действии колхицина на специфическую энкефалиновую флуоресценцию две из трех крыс весом 100 г, в желудочек которых вводили по 100 мкг колхицина, скончались в течение ночи. Большинство крыс, получавших по 10, 25 или 50 мкг колхицина, выживали в течение 48 ч. Иммуногистохимическое окрашивание на энкефалин выявляло наиболее интенсивное окрашивание перикарионов (тел нейронов) крыс, получавших

50 мкг колхицина. Перикарионы были четко прокрашены также у крыс, получивших 25 мкг колхицина и менее хорошо очерчены у крыс, получавших 10 мкг колхицина (Юл, Кухар и Снайдер, неопубликованные данные). Во второй серии предварительных экспериментов окрашивание также было более интенсивным у крыс, получавших 50 мкг колхицина за 48 ч до забоя, чем у крыс, получавших колхицин за 24 ч до забоя. У крыс, забитых через 4 ч после инъекции колхицина, отмечено только некоторое разбухание флуоресцирующих волокон или терминалей по сравнению с необработанными крысами весом 100 г.

Исходя из этих результатов и учитывая при этом, что введением в желудочек колхицина можно выявить тела нейронов, расположенных каудально, в области obex, в дальнейших исследованиях для улучшения визуализации пептидсодержащих тел нейронов мы вводили 50 мкг колхицина в 25 мкл 0,9%-ного раствора NaCl за 48 ч до перфузии мозга.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ, УКАЗЫВАЮЩИЕ НА СУЩЕСТВОВАНИЕ ПЕПТИДСОДЕРЖАЩЕГО АМИГДАЛОФУГАЛЬНОГО ПУТИ

Девять животных с электролитическими повреждениями ядер миндалин были охарактеризованы по степени повреждения, иммунофлуоресценции энкефалина и иммунофлуоресценции нейротензина. У четырех крыс, у которых унилатеральное повреждение захватывало большую часть центрального ядра миндалины (рис. 2), содержание иммунореактивных энкефалинов и нейротензина в вентролатеральной концевой полоске на поврежденной стороне было значительно ниже, чем на неповрежденной стороне (рис. 3, *А, Б*) (Юл, Кухар, Снайдер, готовится к печати; Юл, Снайдер, готовится к печати). Эти удивительные данные находятся в противоречии с тем фактом, что у других 5 крыс, у которых поврежденная зона сходного размера обходит центральное ядро миндалины (рис. 3, *В*), влияния на флуоресценцию концевой пластинки не наблюдалось. Эти контрольные повреждения вызывают повреждение базолатерального, базомедиального и кортикального ядер миндалины, гиппокампа и pyriform cortex (Юл и др., готовится к печати). Исследование ипсилатерального интерстициального ядра концевой полоски крыс с повреждением центрального ядра миндалины выявляет более умеренное снижение флуоресценции энкефалинов и нейротензина. Эти малые изменения не обнаруживаются ипсилатерально к повреждениям, не затрагивающим центрального ядра, или контрлатерально к повреждениям, захватывающим центральное ядро миндалины.

Результаты, полученные при повреждении миндалины, убедительно указывают на возможность амигдалофугального пептидсодержащего тракта в концевой полоске. Как только мы получили

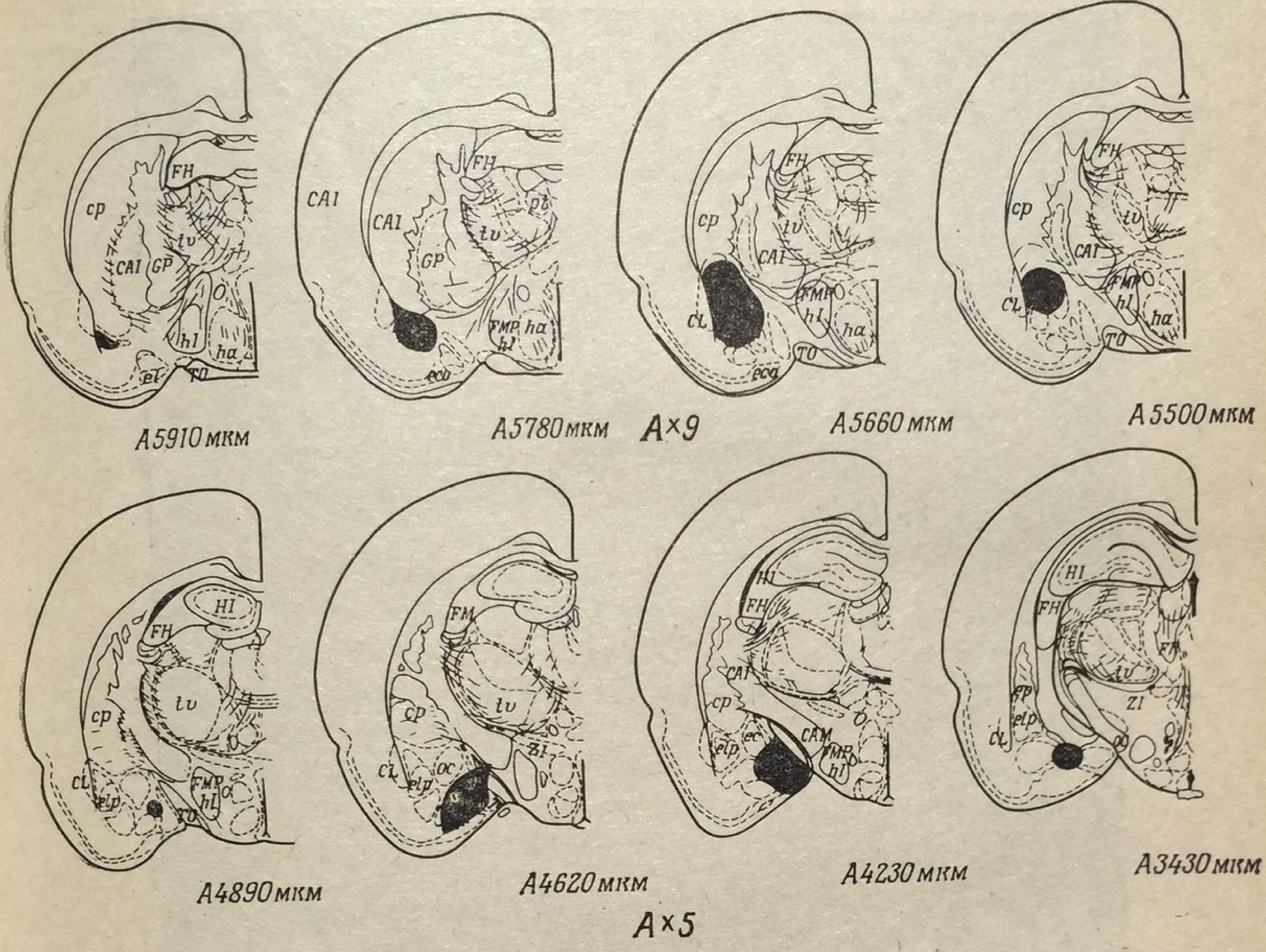


Рис. 2. Типичные электролитические повреждения, разрушающие (Ах9) и обходящие (Ах5) центральное ядро миндалины. Диаграммы по [18].

возможность визуализировать энкефалинсодержащие и нейротензинсодержащие тела нейронов, мы показали, что они локализованы не только в центральном миндалевидном участке, но и в интерстициальном ядре концевой полоски (рис. 4) (Юл и др., готовится к печати). Результаты повреждений ядра миндалины можно, следовательно, объяснить, исходя из ретроградной дегенерации амигдалопетальных волокон, которые, как известно, содержатся в концевой полоске [8]. В связи с этим мы исследовали влияние перерезки концевой полоски на флуоресценцию последней через 2 и 70 ч после операции. Через 2 ч после перерезки в этом тракте отмечены лишь слабые изменения флуоресценции энкефалинов и нейротензина. Через 70 ч после перерезки обнаруживается накопление флуоресцентного материала в вентролатеральном квадранте полоски кзади от линии перерезки, выражающееся в более яркой флуоресценции внутри разбухших энкефалин- и нейротензинсодержащих волокон (рис. 3, Г). Кпереди от линии перерезки флуоресценция, соответствующая обоим пептидам, заметно снижается. Далее, не обнаруживается никаких изменений во флуо-

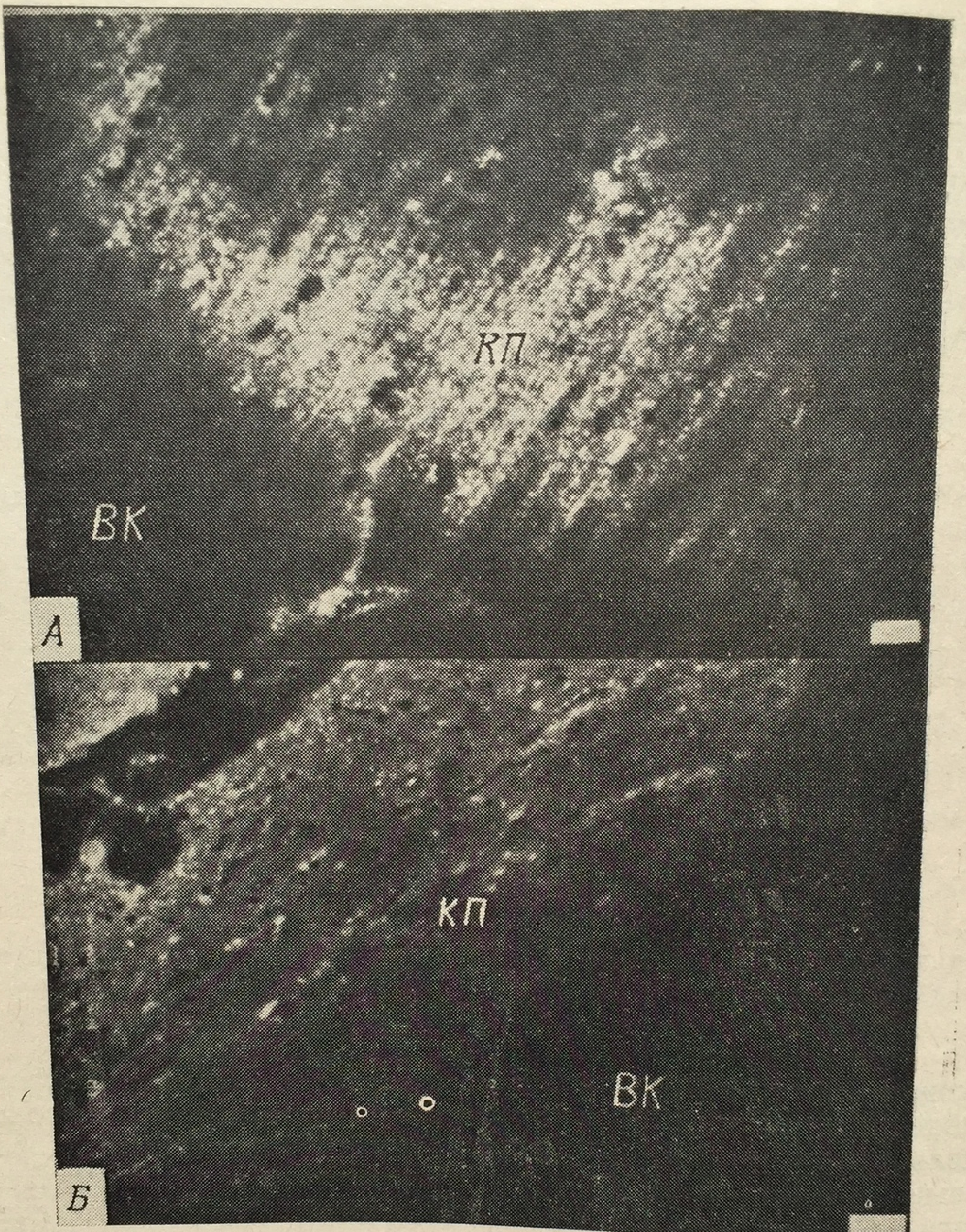


Рис. 3. *А, Б.* Микрофотографии иммунофлуоресценции энкефалина в вентролатеральной концевой полоске (КП) и внутренней капсуле (ВК). *А* — норма. *Б* — ипсилатерально к электролитическому повреждению, разрушающему центральное ядро миндалины.

ресценции в концевой полоске крыс, которым нанесено повреждение сходных размеров в участке, прилежащем, но не затрагивающем этого тракта (Юл, Кухар и Снайдер, готовится к печати). Незначительное уменьшение флуоресценции энкефалинов и нейротензина, наблюдаемое после перерезки, повреждающей концевую полоску, и в этом случае обнаруживается в интерстициальном ядре концевой полоски.

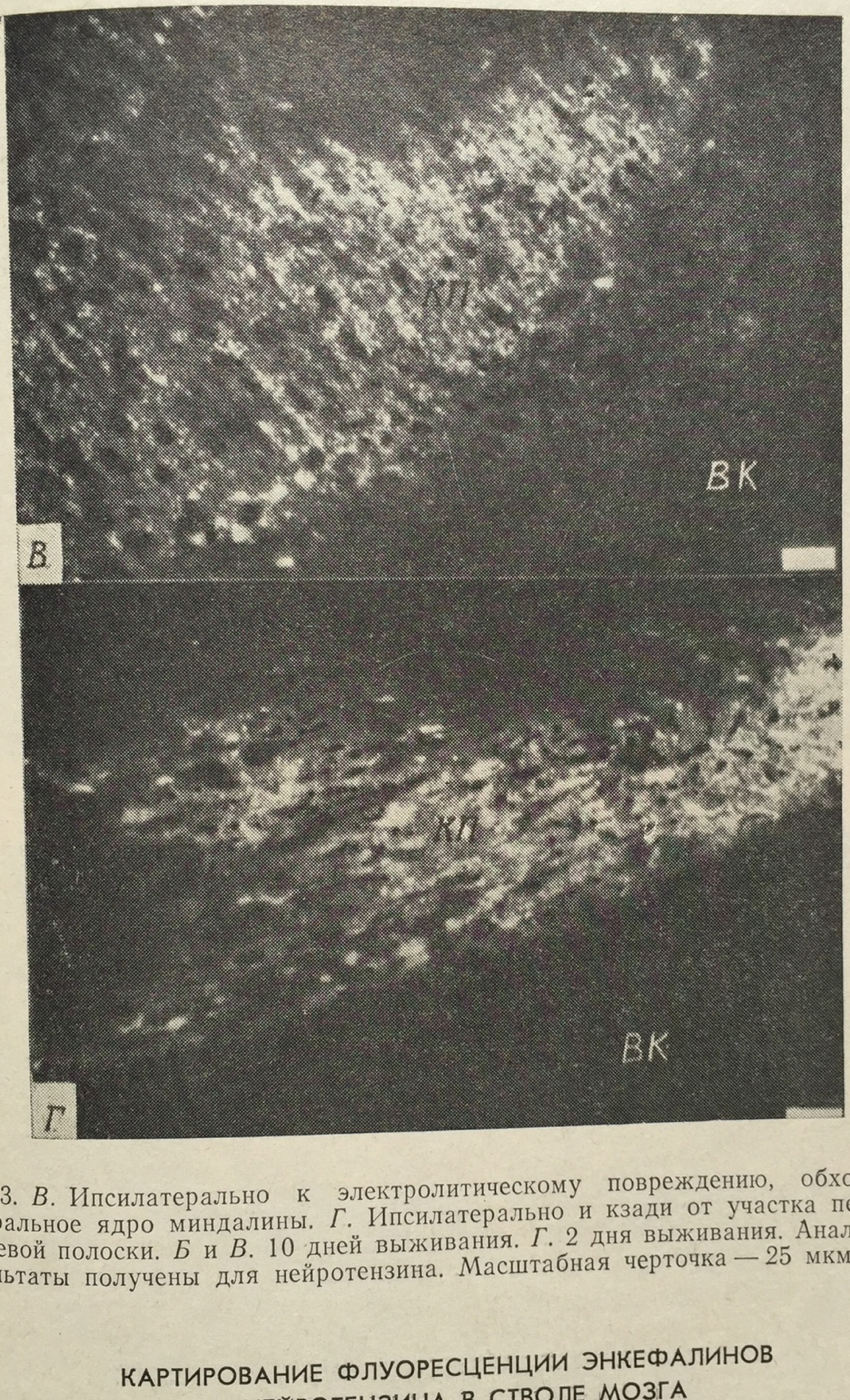
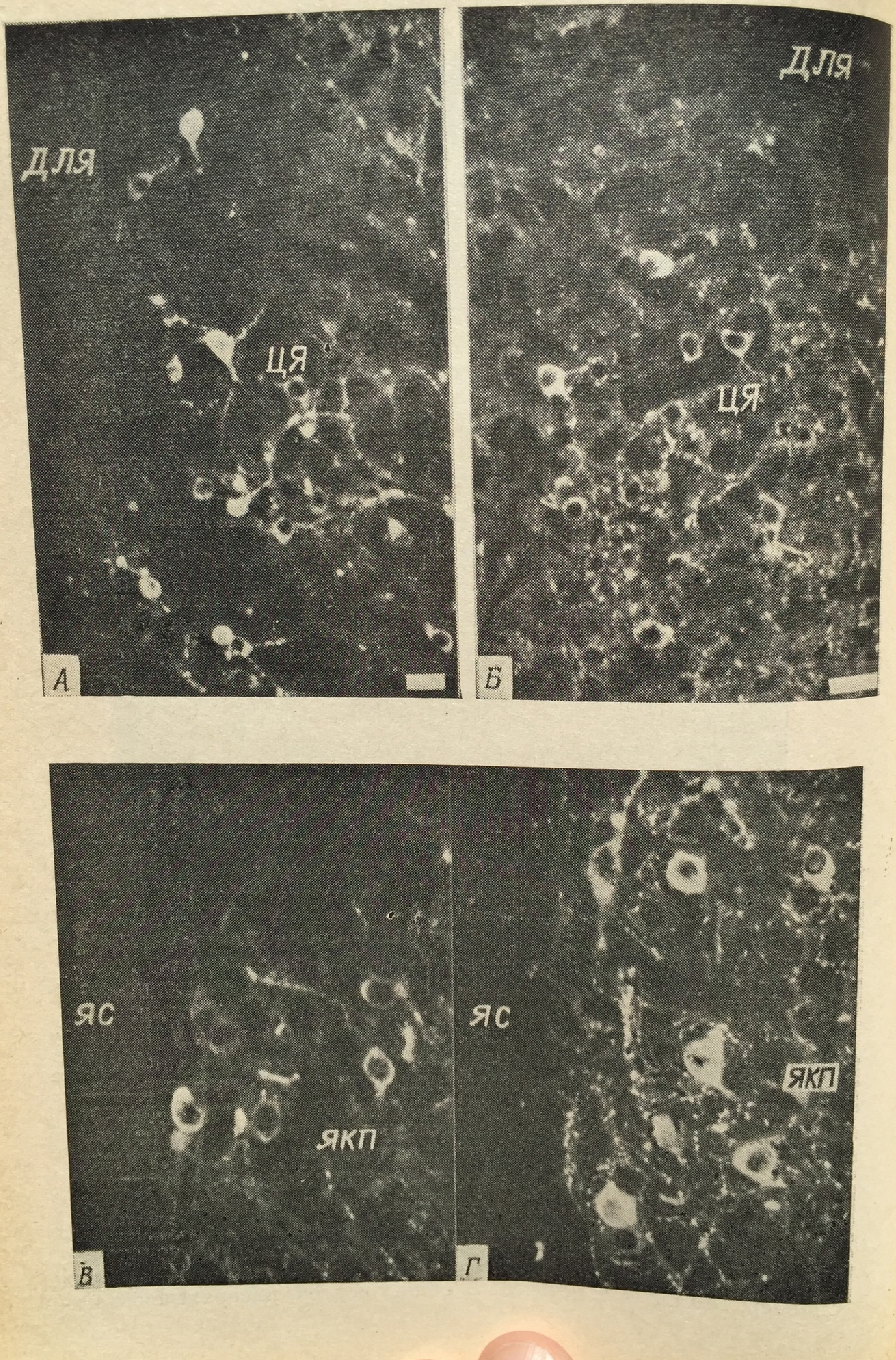


Рис. 3. *В*. Ипсилатерально к электролитическому повреждению, обходящему центральное ядро миндалины. *Г*. Ипсилатерально и кзади от участка перерезки концевой полоски. *Б* и *В*. 10 дней выживания. *Г*. 2 дня выживания. Аналогичные результаты получены для нейротензина. Масштабная черточка — 25 мкм.

КАРТИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЭНКЕФАЛИНОВ И НЕЙРОТЕНЗИНА В СТВОЛЕ МОЗГА

Мы недавно закончили картирование иммунореактивных по мет-энкефалину, лей-энкефалину и нейротензину волокон, тел нейронов и терминалей в стволе мозга крысы (Юл, Гудман, Кухар и Снайдер, готовится к печати). В общих чертах, распределение им-



мунор
Обнар
кефал
различ
Не
цицепт
30, 32]
мы пол
с инте
реакти
ружен
левой
тройни
его вен
что окр
границ
возмож
спинал
положи
стве и
кефали
ние эти
Реж
энкефал
цептивн
понента
клетки
термина
го нерва
(рис. 7,
раолив
подобны
В з
дальног
тонкого
иммунос
пределе
нейроте
правлен
В ж
ках мы

Рис. 4. М
тельно ко
ральном (
ресценция
вой полос
25 мк.

мунореактивности по мет- и лей-энкефалину имеет много общего. Обнаруживается значительное перекрывание в распределении энкефалинов и нейротензина, хотя наблюдаются и существенные различия в распределении этих пептидов.

Недавно была обнаружена связь мет-содержащих систем с ноцицептивными системами [15]. В более ранних работах [24, 28, 30, 32], а также в исследованиях, проводимых в настоящее время, мы получили аналогичные результаты для мет- и лей-энкефалинов с интересными параллелями в отношении нейротензина. Иммунореактивные по энкефалинам и нейротензину тела нейронов обнаружены в областях, участвующих в передаче или модуляции болевой информации, таких, как nucleus caudalis спинального тракта тройничного нерва и периакведуктальное серое вещество, особенно его вентральная часть (рис. 5, 6, 10, 11). Кроме того, установлено, что окрашиваемые на энкефалин перикарионы расположены на границе или даже внутри nucleus raphé magnus, которое служит, возможно, промежуточным пунктом в нисходящей модуляции спинальной болевой информации (рис. 7). Плотность энкефалин-положительных перикарионов в периакведуктальном сером веществе и вблизи от raphé magnus заметно выше, чем плотность энкефалин-положительных волокон и терминалей. Возможное значение этих наблюдений мы рассмотрим ниже.

Реже появляются работы, в которых подчеркивается, что связь энкефалин-положительных тел нейронов с «классическими» ноцицептивными системами является их связью и с некоторыми компонентами слуховой системы [7, 9, 12]. Энкефалинсодержащие клетки видны наряду с умеренной плотной волокноподобной и терминалеподобной флуоресценцией в дорсальном ядре улиткового нерва и вдоль медиальной части наружной петли среднего мозга (рис. 7, 9). Они видны также в низшем бугорке и в областях параоливового ядра и медиального колена вместе с редкими волокноподобными и терминалеподобными структурами.

В зоне «желатинозного вещества» (substantia gelatinosa) каудального ядра тройничного нерва обнаруживается яркий пример тонкого различия в локализации нейротензиновой и энкефалиновой иммунофлуоресценции (рис. 5 и 6). Тогда как энкефалины распределены преимущественно в латеральной области этого ядра, нейротензинсодержащие волокна и перикарионы собираются в направлении медиального края желатинозного вещества.

В желатинозном веществе тройничного нерва и в других участках мы подтвердили существование многочисленных групп энке-

---

Рис. 4. Микрофотографии иммунофлуоресценции у крыс, получавших предварительно колхицин. Флуоресценция нейротензина *(А)* и энкефалина *(Б)* в центральном (ЦЯ) и дорсальном латеральном (ДЛЯ) амигдалоидных ядрах. Флуоресценция нейротензина *(В)* и энкефалина *(Г)* в интерстициальном ядре концевой полоски (ЯКП) и хвостатого ядра/скорлупы (ЯС). Масштабная черточка — 25 мк.

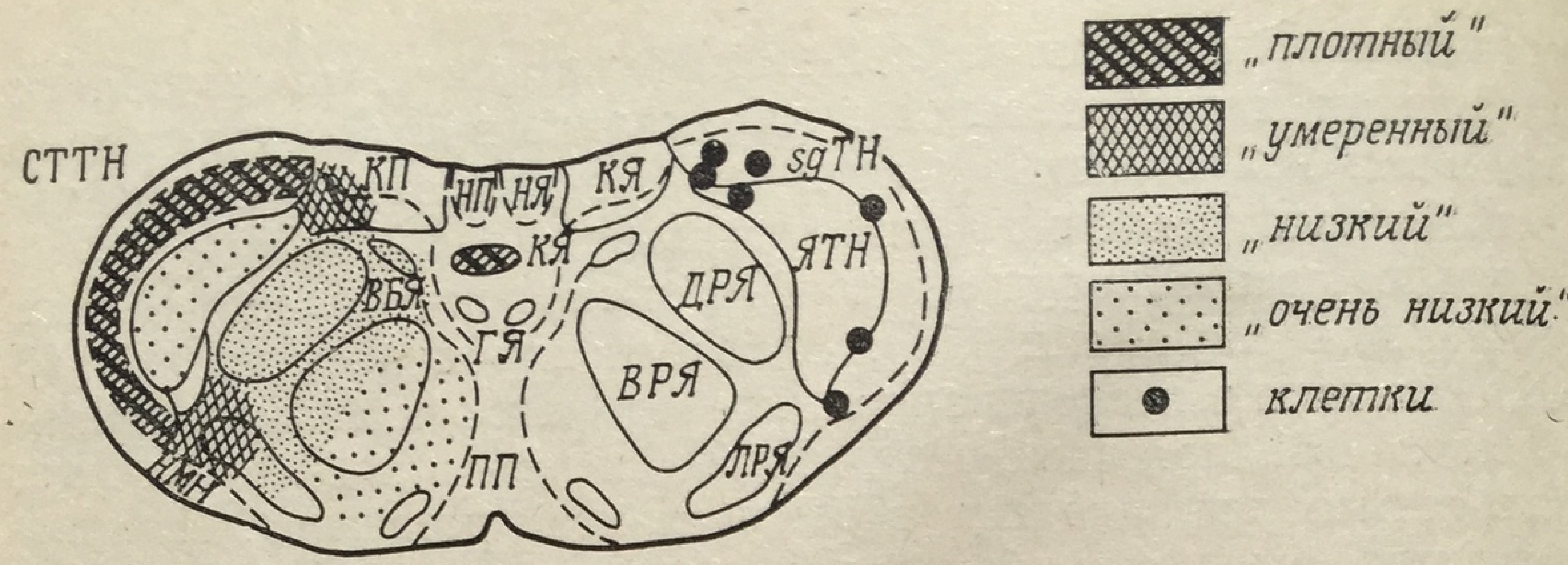

„плотный"
„умеренный"
„низкий"
„очень низкий"
клетки
СТТН
КП
НП
НЯ
КЯ
sgTH
КЯ
ЯТН
ВБЯ
ДРЯ
ГЯ
ВРЯ
НМН
ПП
ЛРЯ

Рис. 5. Иммунофлуоресценция энкефалина в перекресте пирамид. Сокращения: КЯ — клиновидное ядро; ПП — перекрест пирамид; КП — клиновидный пучок; НП — нежный пучок; НЯ — нежное ядро; ВБЯ — внешнее базилярное ядро Каджала; КЯ — комиссуральное ядро; ДРЯ — дорсальное медуллярное ретикулярное ядро; ВРЯ — вентральное медуллярное ретикулярное ядро; ЯТН — ядро спинального тракта тройничного нерва; ГЯ — гипоглоссальное ядро; НМН — нижняя мозжечковая ножка; ЛРЯ — латеральное ретикулярное ядро; sgTH — substantia gelatinosa тройничного нерва; СТТН — спинальный тракт тройничного нерва. Уровень соответствует Р8 (см. [21]).

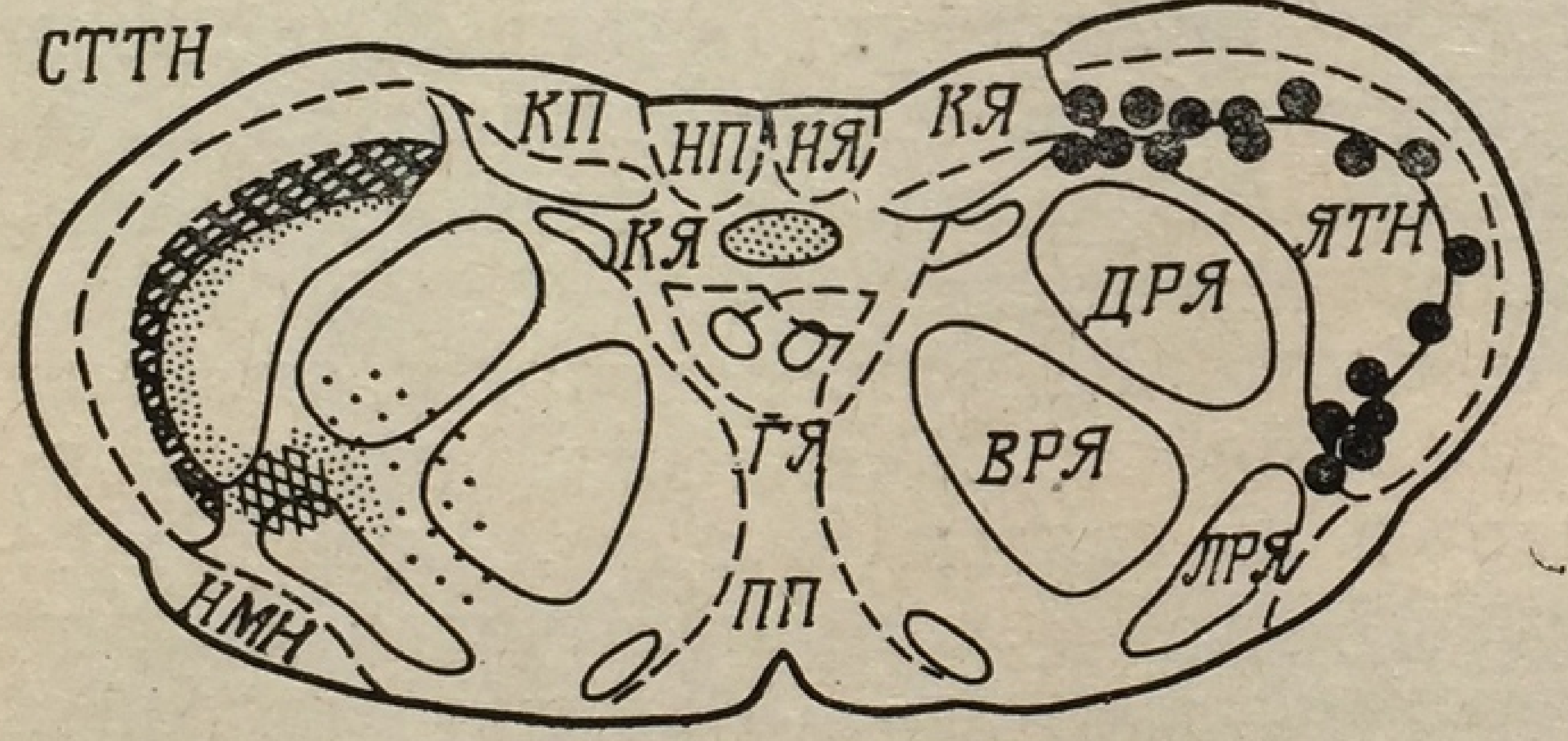

СТТН
КП
НП
НЯ
КЯ
КЯ
ЯТН
ДРЯ
ГЯ
ВРЯ
НМН
ПП
ЛРЯ

Рис. 6. Иммунофлуоресценция нейротензина в перекрестке пирамид. Обозначения интенсивности флуоресценции, сокращения и уровень те же, что и на рис. 5.

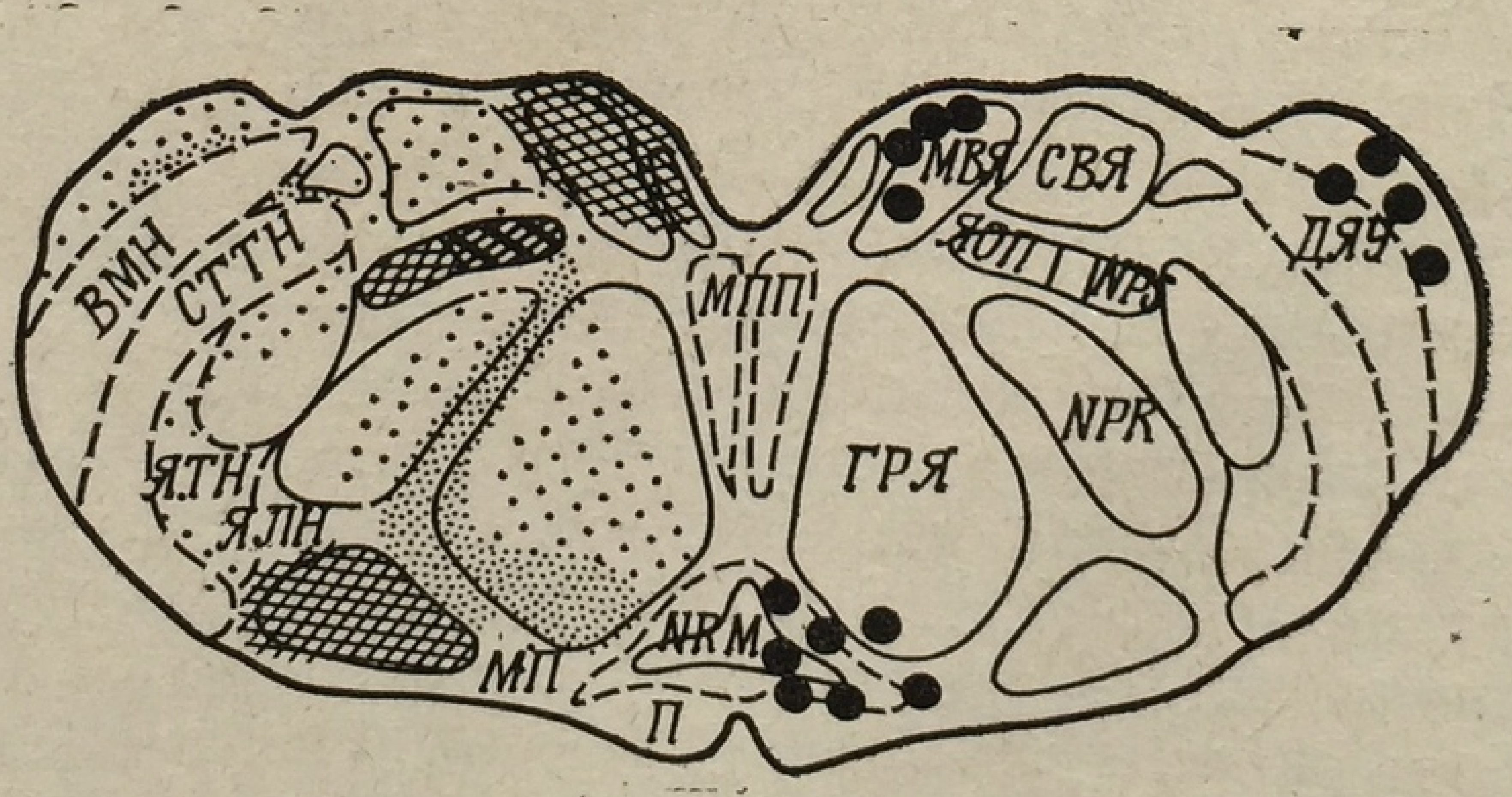

МВЯ
СВЯ
ДЯУ
ЯОП
NPs
ВМН
СТТН
МПП
NPR
ГРЯ
ЯТН
ЯЛН
NRM
МП
П

Рис. 7. Иммунофлуоресценция энкефалина на уровне raphe magnus. Сокращения: ДЯУ — дорзальное ядро улиткового нерва; МПП — медиальный продольный пучок; МП — медиальная петля; ЯОП — ядро одиночного пучка; ЯТН — ядро спинального тракта тройничного нерва; ЯЛН — ядро лицевого нерва; П — пирамида; ВМН — верхняя мозжечковая ножка; NRM — nucleus raphe magnus; ГРЯ — гигантоклеточное ретикулярное ядро; NPs — nucleus parasolitary; NPR — nucleus parvocellular reticular; СТТН — спинальный тракт тройничного нерва; МВЯ — медиальное вестибулярное ядро; СВЯ — спинальное ядро. Уровень соответствует Р 5,0 по [21]. Обозначения интенсивности флуоресценции, те же, что и на рис. 5.

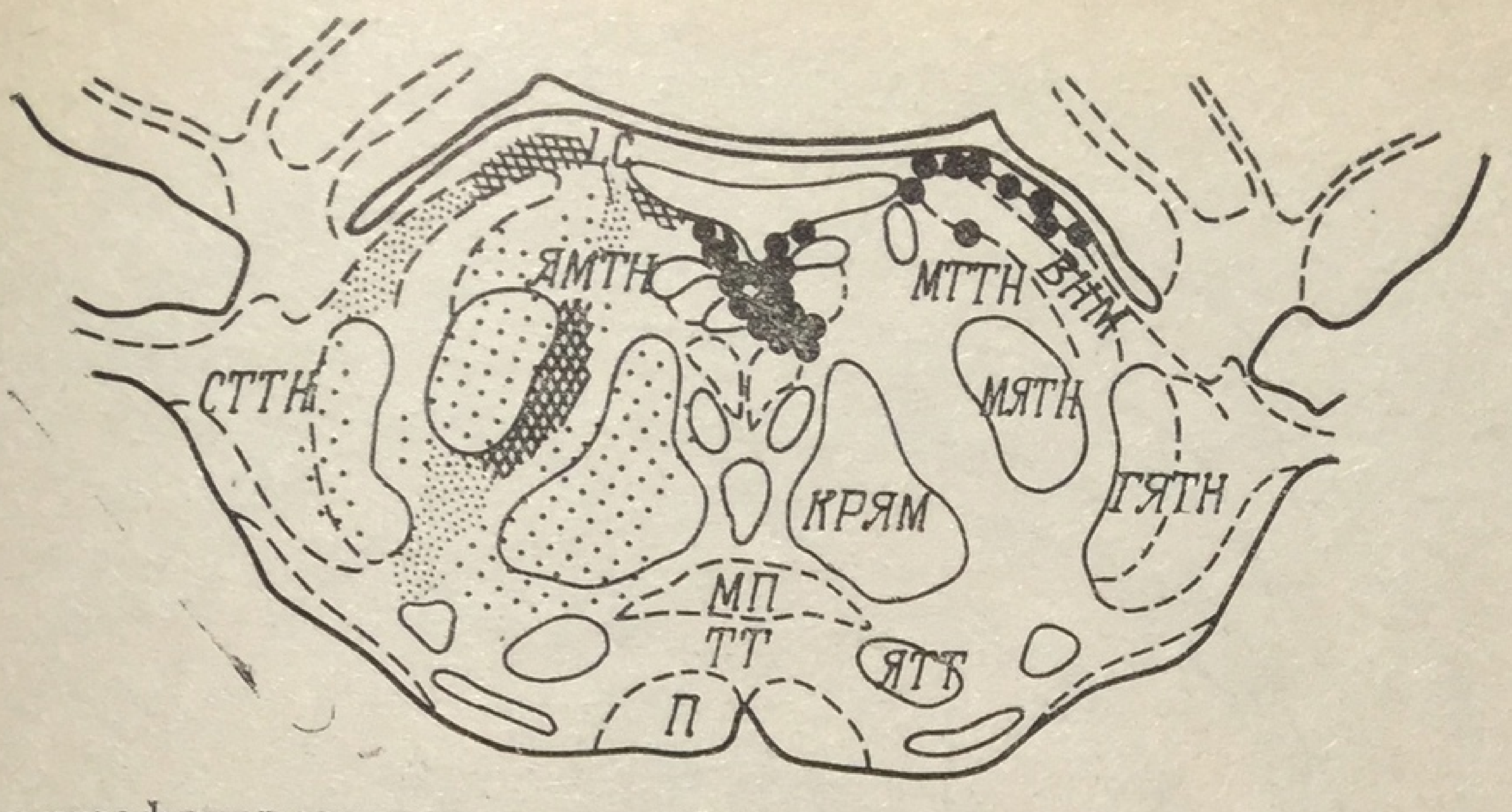


Рис. 8. Иммунофлуоресценция энкефалина на уровне вхождения тройничного нерва. Сокращения: ТТ — трапецеидальное тело; ЯТТ — ядро трапецеидального тела; LC — locus coeruleus; МП — медиальная петля; ГЯТН — главное ядро тройничного нерва; ЯМТН — ядро мезэнцефалического тракта тройничного нерва; МЯТН — моторное ядро тройничного нерва; П — пирамида; ВНМ — верхняя ножка мозжечка; КРЯМ — каудальное ретикулярное ядро мозжечка; МТТН — мезэнцефалический тракт тройничного нерва; СТТН — спинальный тракт тройничного нерва. Уровень соответствует Р 2,3 по [21]. Обозначения интенсивности флуоресценции те же, что и на рис. 5.

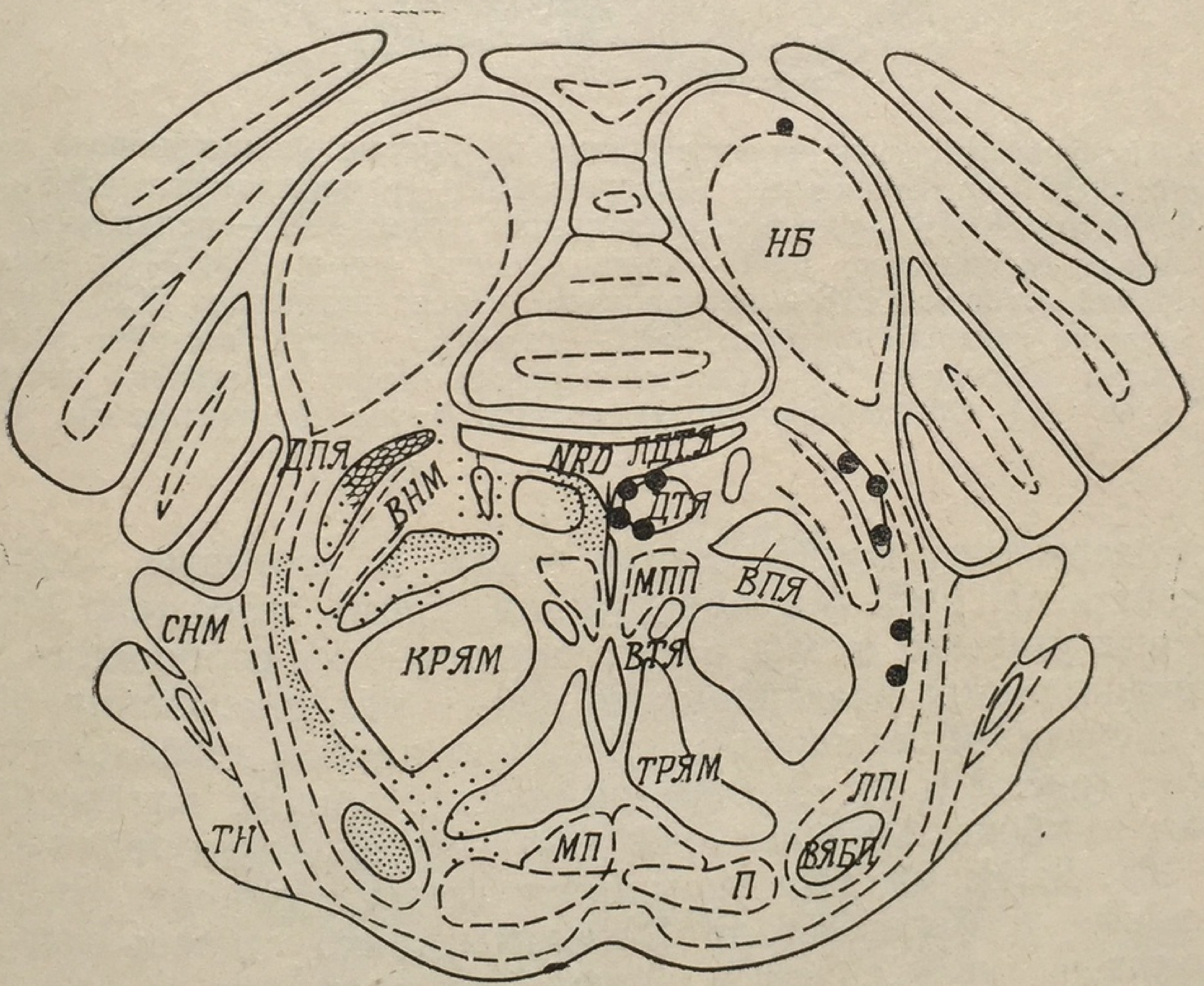


Рис. 9. Иммунофлуоресценция энкефалина в соединении среднего и промежуточного мозга. Сокращения: НБ — нижний бугорок; МПП — медиальный продольный пучок; ЛП — латеральная петля; ВЯБП — вентральное ядро боковой петли; МП — медиальная петля; ДПЯ — дорсальное парабрахиальное ядро; ВПЯ — вентральное парабрахиальное ядро; ДТЯ — дорсальное тегментальное ядро Гуддена; ЛДТЯ — латеральное дорсальное тегментальное ядро Гуддена; ВТЯ — вентральное тегментальное ядро Гуддена; П — пирамида; СНМ — средняя ножка мозжечка; ВНМ — верхняя ножка мозжечка; NRD — nucleus raphe dorsal; КРЯМ — каудальное ретикулярное ядро моста; ТРЯМ — тегментальное ретикулярное ядро моста; ТН — тройничный нерв. Уровень соответствует Р 1,5 по [21]. Обозначения интенсивности флуоресценции те же, что и на рис. 5.

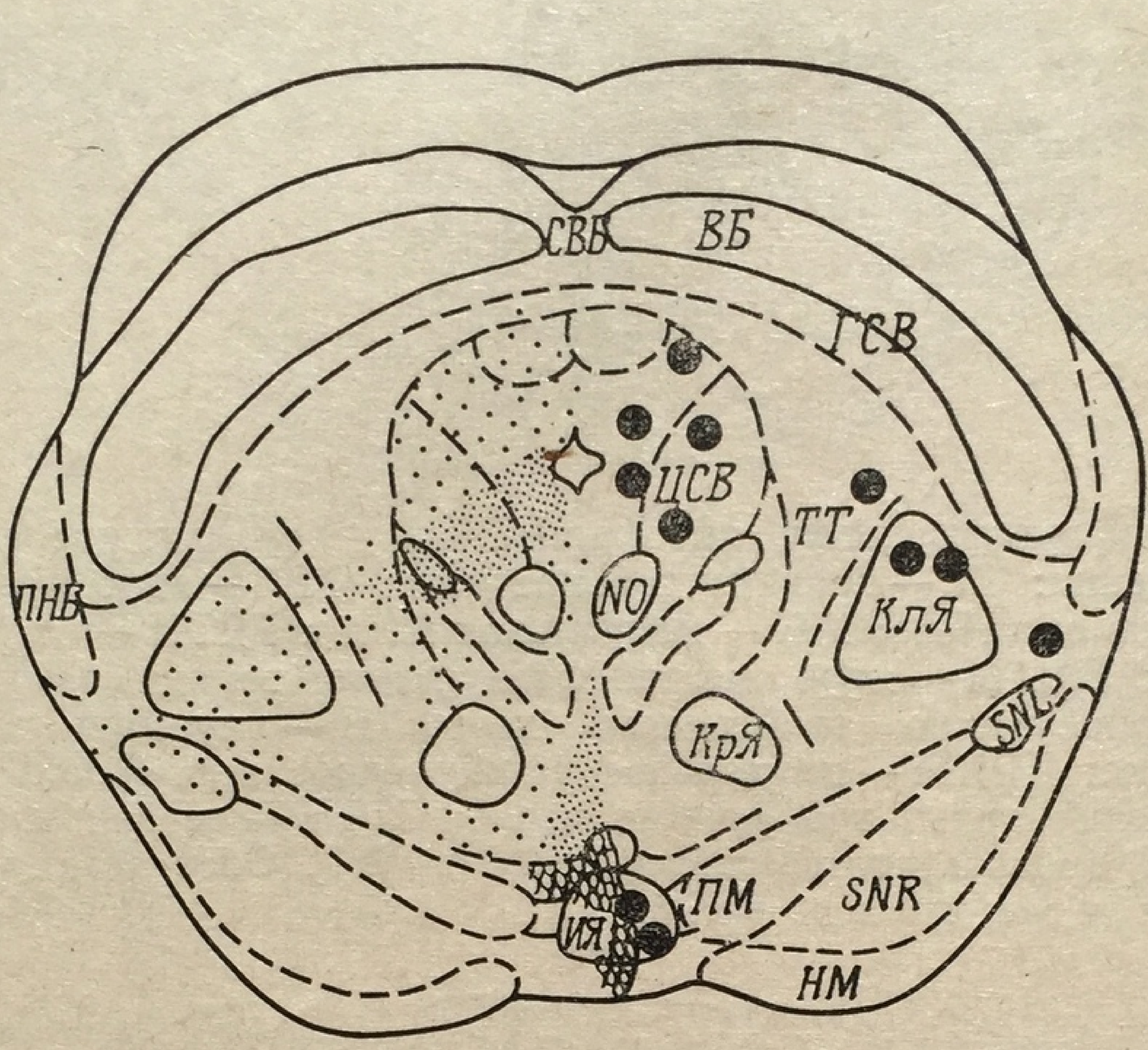


Рис. 10. Иммунофлуоресценция энкефалина на уровне межножкового узла. Сокращения: ПНБ — плечо нижнего бугорка; НМ — ножка мозга; СВБ — спайка верхнего бугорка; ИЯ — интерпедункулярное ядро; МП — медиальная петля; NO — nucleus occulomotor; КлЯ — клинообразное ядро; КрЯ — красное ядро; ВБ — верхний бугорок; ЦСВ — центральное серое вещество; ГСВ — глубинное серое вещество верхнего бугорка; SNL — substantia nigra lateralis; SNR — substantia nigra reticularis; ТТ — тектоспинальный тракт. Уровень соответствует А 1,4 по [21]. Обозначения интенсивности флуоресценции те же, что и на рис. 5.

фалинсодержащих клеток ствола мозга, на которые ссылаются Хёкфельт и др. [14]. Мы обнаружили, кроме того, тела клеток в некоторых участках мозга, о которых ранее не сообщалось. Плотная группа клеток, реактивных по лей- и мет-энкефалину, обнаружена в пучке, обходящем медиальную часть дорсального ядра Гуддена (рис. 8 и 9). Энкефалин-положительные клетки обнаруживаются также в медиальной части интерпедункулярного ядра (рис. 10). Выше мы уже упоминали клетки в нижнем бугорке, не отмеченные Хёкфельтом и др. В целом, однако, степень совпадения результатов, полученных в нашей лаборатории, и результатов Хёкфельта и др. значительно превышает расхождение этих результатов.

Обсуждение

Радиоиммунологическая специфичность сывороток, использованных в наших исследованиях, в сочетании со способностью предварительной адсорбции подавлять специфическую флуоресценцию

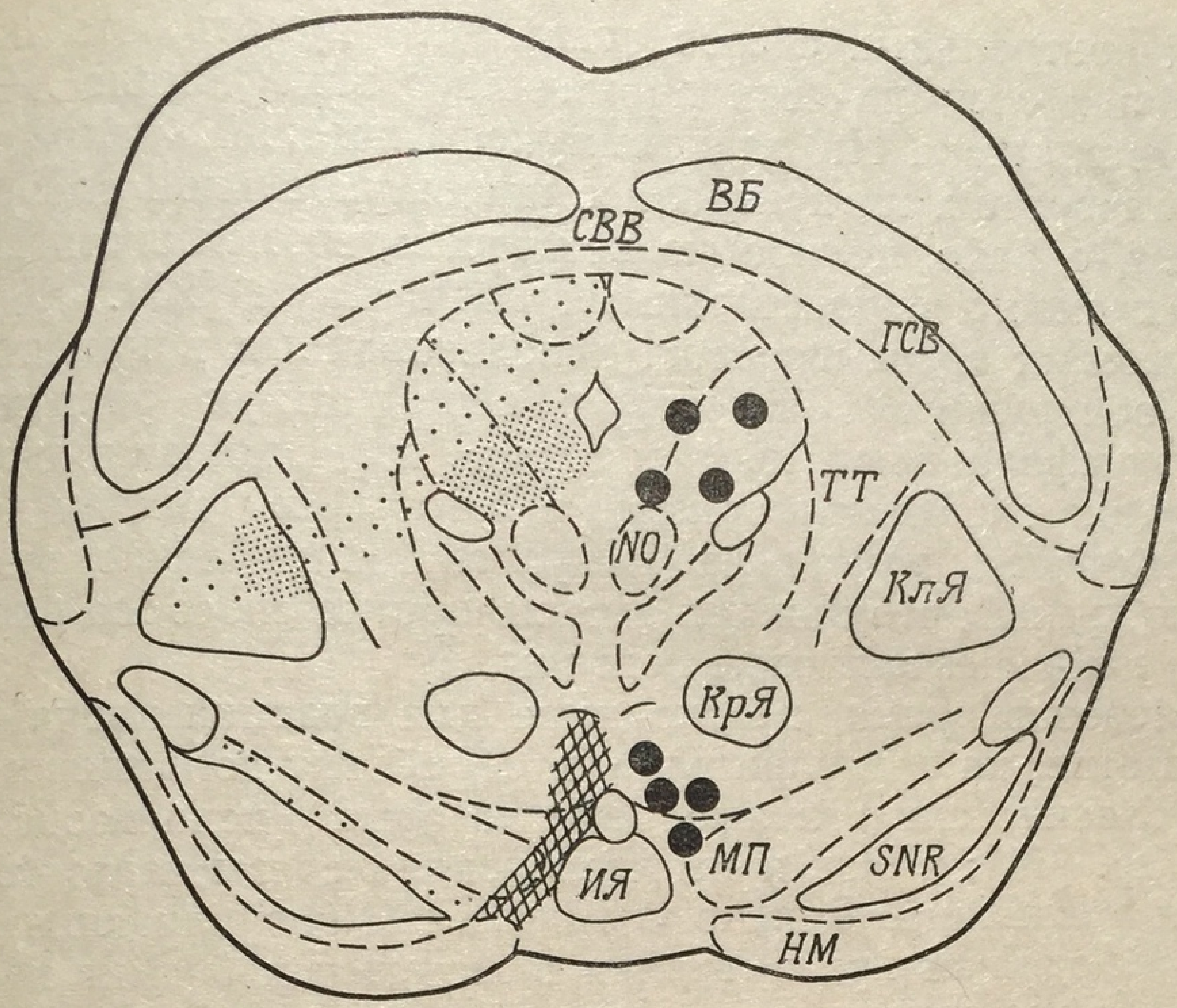

ВБ
СВВ
ГСВ
ТТ
NO
КлЯ
КрЯ
МП
SNR
ИЯ
НМ

Рис. 11. Иммунофлуоресценция нейротензина на уровне интерпедункулярного узла. Сокращения, обозначения интенсивности флуоресценции и уровень те же, что и на рис. 10.

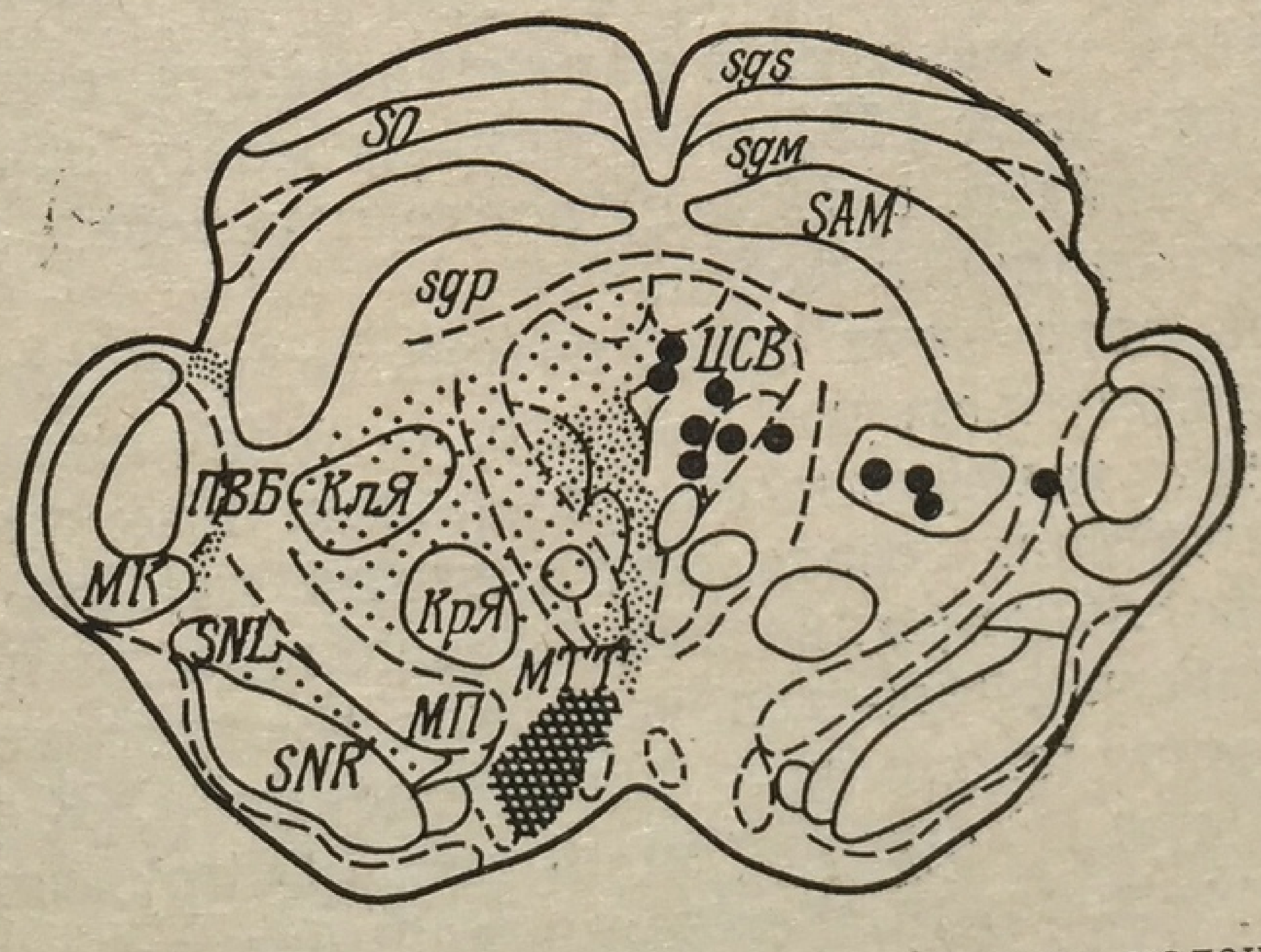

sgs
SO
sgm
SAM
sgp
ЦСВ
ПВБ
КлЯ
МК
КрЯ
SNL
МТТ
МП
SNR

Рис. 12. Флуоресценция энкефалина на уровне медиального колена. Сокращения: ПВБ — плечо верхнего бугорка; МТТ — маммило-тегментальный тракт; МП — медиальная петля; МК — медиальное колено; КлЯ — клинообразное ядро; КрЯ — красное ядро; SAM, sgm, sgp, sgs, SO — слои верхнего бугорка; ЦСВ — центральное серое вещество; SNL — substantia nigra lateralis; SNR — substantia nigra reticularis. Уровень соответствует А 2,2 по [21]. Обозначения интенсивности флуоресценции те же, что и на рис. 5.

соседних контрольных срезов позволяет думать, что наш метод окрашивания специфически промечивает энкефалины и нейротензин в срезах ткани. Ни радиоиммунологический анализ использованных сывороток, ни контроли с предварительной адсорбцией не позволяют, однако, полностью исключить возможность перекрестной реактивности с родственными антигенами [23]. Каждая из энкефалиновых антисывороток, использованных в наших исследованиях, обнаруживает некоторую перекрестную реактивность с другим энкефалиновым пентапептидом в радиоиммунологическом тесте. Трудно определить степень, в которой эта слабая перекрестная реактивность влияет на иммуногистохимические результаты, но можно думать, что каждая антисыворотка способна окрашивать и мет-, и лей-энкефалиновые пептиды.

Исследовав время, необходимое для возникновения флуоресценции в ответ на предварительную обработку колхицином, мы выбрали условия, аналогичные тем, которые использовали Хёкфельт и др. [14]; и они, и мы исследовали срезы через 48 ч после введения колхицина. Однако оптимальная визуализация тел нейронов наблюдалась при инъекции в желудочек 50 мкг колхицина, и этой дозе мы отдали предпочтение перед дозой 10—25 мкг, использованной Хёкфельтом и др. [14].

Сведения о том, что энкефалины часто содержатся в интернейронах некоторых участков мозга, подтверждаются следующими данными: 1) сходной локализацией определяемых радиоавтографически опиатных рецепторов и энкефалиновой флуоресценцией в мозгу [24], 2) общим параллелизмом между плотностью энкефалинсодержащих тел нейронов и волокно-, и терминалеподобных флуоресцирующих структур ([14], Юл и др., готовится к печати) и 3) отсутствием изменений в характере флуоресценции энкефалина в заднем роге крыс [13] или спинном мозгу обезьян (Ла Мотте, Юл, Кухар и Снайдер, в печати) после перерезки задних корешков или рассечения спинного мозга.

Многие из описанных здесь результатов картирования или повреждения свидетельствуют, однако, о проецировании по крайней мере некоторых энкефалиновых нейронов. Как указывалось выше, в некоторых участках ствола мозга, таких, как периакведуктальное серое вещество, обнаруживается выраженная диспропорция между высокой флуоресценцией тел нейронов и относительно низкой волокно- и терминалеподобной флуоресценцией. В участках, расположенных вблизи от nucleus ambiguus, обнаруживается, наоборот, обширная сеть волокон и терминалей без видимых энкефалинположительных тел нейронов. Эти результаты свидетельствуют о существовании энкефалинсодержащих проекций из периакведуктального серого вещества и проекций в nucleus ambiguus, хотя и не исключено, что использованный нами метод не дает возможности выявить определенные тела нейронов.

В наших опытах по изучению концевой полоски мы получили даже более веские доводы в пользу существования энкефалинов в длинных трактах мозга, в которых отростки исходят из тел нейронов в центральном миндалевидном ядре и которые проходят затем через вентролатеральную область концевой полоски на расстояния в несколько миллиметров. Отсутствие существенного снижения флуоресценции нейротензина и энкефалина в интерстициальном ядре концевой полоски после повреждения концевой полоски может быть объяснено двумя путями. Тракт из центральной области миндалины может обеспечивать лишь малую часть волокно- и терминалеподобной флуоресценции в интерстициальном ядре концевой полоски. В этом случае главная часть энкефалиновых и нейротензиновых терминалей в этой области может принадлежать интернейронам, тела которых находятся в той же самой структуре. Если это так, то мы не вправе ожидать подавления большей части флуоресценции в этом участке при дистальном повреждении. С другой стороны, тракт, о котором шла речь, может оканчиваться в каком-либо другом участке. Неудача наших попыток обнаружить связанные с повреждением изменения во флуоресценции энкефалинов и нейротензина в какой-либо одной из других классических зон терминации концевой полоски говорит, однако, против второго предположения. Несмотря на эти обстоятельства, затрудняющие интерпретацию полученных данных, мы все же думаем, что рассмотренная пептидсодержащая система представляет собой, как нам известно, первый энкефалин- или нейротензин-содержащий тракт, обнаруженный в мозгу, свидетельствующий о том, что не все энкефалины содержатся в интернейронах.

Многие места локализации энкефалинов в стволе мозга представляют собой анатомические участки, играющие определенную роль в модулируемых опиатами функциях. В качестве примера можно сослаться на рассматриваемые в других работах [4, 15, 29] участки взаимодействия с болевыми и респираторными системами. Функциональная роль других энкефалинсодержащих систем и почти всех нейротензинсодержащих систем остается невыясненной.

Список литературы

1. *Atweh S., Kuhar M.* Brain Res., **124**, 53—67 (1977).
2. *Atweh S., Kuhar M.* Brain Res., **129**, 1—12 (1977).
3. *Atweh S., Kuhar M.* Brain Res. (1977). In press.
157, 29—42 (1976).
4. *Basbaum A., Clanton C., Fields H.* J. Comp. Neurol.,
248, 6854—6861 (1974).
5. *Carraway R., Leeman S.* J. Biol. Chem.,
250, 1907—1911 (1975).
6. *Carraway R., Leeman S.* J. Biol. Chem.,
7. *Childers S., Snyder S.* Eur. J. Pharmacol. (1977). In press.
28,
8. *Cowan M., Raisman G., Powell T.* J. Neurol. Neurosurg. and Psychiat.,
137—151 (1965).
pp. 145—
9. *deOlmos J.* In: The Neurobiology of the Amygdala, ed. B. Eleftheriou,
204, Plenum Press, New York (1972).
1, 349—355 (1976).
10. *Elde R., Hökfelt T., Johannson O., Terenius L.* Neurosci.,

11. *Engel J., Katzman R.* Brain Res., **122**, 137—142 (1977).
12. *Fields H., Basbaum A.* Ann. Rev. Physiol. (1978). In press.
13. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Ljungdahl A., Schultzberg M., Fuxe K., Goldstein M., Nilsson G., Pernow B., Terenius L., Ganteu D., Jeffcoate S., Rehfield J., Said S.* In: American College of Neuropharmacology, eds. M. Lipton. G. Aghajanian and F. Bloom, Raven Press, New York (1977). In press.
14. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neurosci. Letters, 5, 25—31 (1977).
15. *Hökfelt T., Ljungdahl A., Terenius L., Elde R., Nilsson G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **7**, 3081—3085 (1977).
16. *Hughes J., Smith T., Kosterlitz H., Fotheregill L., Morgan B., Morris H.* Nature, **268**, 577—579 (1975).
17. *Kitabgi P., Carraway R., Van Rietschoten J., Granier C., Morgat J., Menez A., Leeman S., Freychet P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 1846—1850 (1977).
18. *Konig J., Klippel R.* The Rat Brain. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1963).
19. *Lazarus L., Brown M., Perrin M.* Neuroendocrinol. (1977). In press.
20. *Miczek K., Brykczynski T., Grossman S.* J. Comp. Physiol. Psychol., **87**, 760—771 (1974).
21. *Palkovitz M., Jaeobowitz D.* J. Comp. Neurol.. **157**, 29—42(1974).
22. *Pert C., Kuhar M., Snyder S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3724—3733 (1976).
23. *Petrusz P., Sav M., Ordronneau P., DiMeo P.* J. Histochem. Cytochem., 24, 1110—1115 (1976).
24. *Simantov R., Kuhar M., Uhl G., Snyder S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 2167—2171 (1977).
25. *Simantov R., Snyder S.* Life Sci., **18**, 781—788 (1976).
26. *Terasawa E., Kawakami M.* Endocrinol. Jpn., **21**, 51—60 (1974).
27. *Uhl G., Bennett J., Snyder S.* Abs. Soci. for Neurosci., **2**, 803 (1976).
28. *Uhl G., Bennett J., Snyder S.* Brain Res., **130**, 299—313 (1977).
29. *Uhl G., Childers S., Snyder S.* In: Frontiers in Neuroendocrinology, **5** (1978). In press.
30. *Uhl G., Kuhar M., Snyder S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1977). In press.
31. *Uhl G., Snyder S.* Life Sci., **19**, 1827—1832 (1976).
32. *Uhl G., Snyder S.* Eur. J. Pharmacol., **41**, 88—91 (1977).

β-ЭНДОРФИН. ЛОКАЛИЗАЦИЯ В КЛЕТКЕ, ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Ф. Е. БЛЮМ, Дж. РОССЬЕ, Е. Л. Ф. БАТТЕНБЕРГ, А. БАЙОН,
Е. ФРЕНЧ, С. Дж. ХЕНРИКСЕН, Г. Р. СИГГИНС, Д. СЕГАЛ,
Р. БРАУН, Н. ЛИНГ, Р. ГУИЛЛЕМИН

(F. E. Bloom, J. Rossier, E. L. F. Battenberg, A. Bayon,
E. French, S. J. Henriksen, G. R. Siggins, D. Segal,
R. Browne, N. Ling, R. Guillemin)

Введение

Всего два года назад была идентифицирована первая пара эндогенных опиоидных пептидов — мет^5-энкефалин и лей^5-энкефалин [20, 21], причем оказалось, что их структура полностью или частично содержится в гормоне гипофиза, β-липотропине, аминокислотная последовательность которого была уже установлена. Вскоре после этого в экстрактах мозга и гипофиза были обнаружены еще три фрагмента β-липотропина (β-ЛПГ) [4, 7, 26, 27], и было показано, что они также обладают опиоидной активностью. Это: α-эндорфин (βЛПГ$_{61-76}$), γ-эндорфин (β-ЛПГ$_{61-77}$) и β-эндорфин, или С-фрагмент (β-ЛПГ$_{61-91}$). В той бурной деятельности, которая последовала за выделением и синтезом этих пептидов, наши попытки были направлены главным образом на выяснение следующих вопросов: где запасается β-эндорфин в мозгу [2, 34] и гипофизе [1] и возможны ли различия в рецепторных свойствах структур, реагирующих на энкефалины и эндорфины на клеточном [12, 32], многоклеточном [17] и поведенческом [3, 24, 35] уровнях. И наконец, мы стремились решить «заезженный» вопрос о взаимосвязи клеток, содержащих эндорфины, энкефалины и другие пептидные гормоны. В этом обзоре мы попытаемся «отчитаться в успехах», достигнутых на сегодняшний день в нашей лаборатории по каждому из этих направлений.

Иммунохимические исследования

Все природные опиоидные пептиды имеют одинаковую N-концевую последовательность с С-концевым фрагментом β-ЛПГ. Хотя каждый из этих пептидов обладает агонистическими свойствами в нескольких системах, используемых для биотестов или для изучения связывания с рецепторами [4, 5, 7, 13, 26, 27, 36, 38, 46], ни одна из этих систем не обеспечивает прямой оценки любого из этих пептидов. Согласно ряду данных, при использовании иммунологических тестов на энкефалины в экстрактах мозга не удается выявить более крупные опиоидные пептиды, хотя другие авторы, использовавшие опыты с замещением, высказали предположение, что энкефалины, возможно, являются всего лишь продуктами распада эндорфинов [13].

Для разрешения этой проблемы мы разработали специфическую антисыворотку, способную отличать энкефалиновые пентапептиды от α- до β-эндорфинов [14].

Специфичность теста: при использованном нами радиоиммунологическом тесте (РИТ) на α- и β-эндофины не наблюдается никакой перекрестной реактивности соответственно с β- и α-эндорфинами и не выявляется никаких энкефалинов. Более подробно об этом сказано в соответствующей статье [14].

РИТ на энкефалины также более подробно описан в другой статье [24]; в этом тесте 16 пг лейцин-энкефалина (иммуногенный пептид) вызывают 50%-ное замещение связанного меченого пептида (сыворотка в разведении 1/4900), причем ни α-, ни β-эндорфин не обнаруживают перекрестной реактивности. Однако параллельное замещение меченого лейцин-энкефалина получено также с метионин-энкефалином при значительном (в 30 раз) молярном избытке последнего. Из-за наличия такой перекрестной реактивности и отсутствия хорошо разработанных тонких методов, основанных на радиоиммунологических тестах, высокоспецифических в отношении пентапептидов или на цианогенбромидной деградации С-концевого метионина для дискриминации двух пентапептидов, результаты, полученные с помощью использованных нами тестов могут быть обусловлены любым из пентапептидов.

Однако, поскольку соотношение лей-энкефалин: мет-энкефалин в разных отделах мозга [46] и у разных видов [13, 21, 36—38] различно, пока еще нельзя, исходя из результатов РИТ с антителами против лей-энкефалина, сделать вывода о точном количестве каждого пентапептида. Поэтому, чтобы избежать путаницы при определении концентрации пентапептидов, мы решили выражать результаты этих РИТ в произвольных энкефалиновых единицах, а затем, исходя из этих значений и предполагая, что весь реактивный материал представлен либо мет-энкефалином, либо лей-энкефалином, экстраполировать молярное содержание любого энкефалина.

Если мозг крысы не содержит мет-энкефалина, то одна энкефалиновая единица (1 ед. энк) будет соответствовать 1 нг лей-энкефалина (или 10^{-3} ед энкефалина будет соответствовать 1 пг лей-энкефалина). Если мозг крыс не содержит лей-энкефалина, а содержит только мет-энкефалин, то 1 ед. энк соответствует 30 нг мет-энкефалина. В результате необходимости выражать наши результаты в общих энкефалиновых «единицах» слабые изменения в содержании мет-энкефалина пройдут незамеченными, а слабое увеличение содержания лей-энкефалина могут быть преувеличены.

Выявляемый РИТ эндорфиновый и энкефалиновый материал в гипофизе крыс. Как уже сообщалось [1, 26, 27], в гипофизе крыс, так же как и в гипофизе мышей, кошек, свиней и лягушек, иммуноцитохимические радиоиммунологические исследования показывают, что α- и β-эндорфин обнаруживаются в каждой клетке интермедиальной доли и в изолированных клетках аденогипофиза, соответствующих клеткам, реактивным к антисыворотке против АКТГ. Ни α-, ни β-эндорфин не обнаруживается в нейрогипофизе ([1], а также данные, готовящиеся к печати). При использовании энкефалиновых РИТ иммунореактивный материал обнаруживается лишь в интермедиальной доле и заднем гипофизе, но почти полностью отсутствует в заднем гипофизе (табл. 1).

Таблица 1

Распределение опиоидных пептидов в гипофизе и мозгу

	Содержание β-эндорфина	Содержание энкефалина
Участки гипофиза	*нг/мг ткани*	*10^{-3} ед. энк/мг ткани*
Целый гипофиз	269±20 (11)	73±4 (6)
Аденогипофиз	128±9 (3)	3,7±0,7 (3)
Pars nervosa+pars intermedia	1500±600 (3)	740±47 (3)
Мозг	*нг/мг ткани*	*ед. энк/г ткани*
Целый мозг	180±8 (10)	25±2 (6)
Гипоталамус	490±30 (5)	120±7 (6)
Перегородка	234±34 (3)	85±7 (6)
Средний мозг	207±14 (5)	32±1 (6)
Костный мозг+варолиев мост	179±5 (5)	30±4 (6)
Полосатое тело	Нет	112±11 (6)
Гиппокамп	»	13±1 (6)
Кора	»	15±2 (6)
Мозжечок	»	5±1 (6)

В дальнейших исследованиях взаимоотношения между β-эндорфином и энкефалином в мозгу и гипофизе оценивали с помощью РИТ после продолжительной гипофизэктомии и адреналэктомии. Ни одна из этих обработок не изменяла существенно количества β-эндорфиноподобного иммунореактивного материала в мозгу, рассматриваемого как истинный β-эндорфин. После адреналэктомии наблюдается соответствующее 5-кратное увеличение содержания β-эндорфина и энкефалина в аденогипофизе; однако при этом воздействии содержание β-эндорфина в интермедиальной и задней доле также увеличивается, а содержание энкефалина остается неизменным. Эти данные показывают, что содержание в гипофизе β-эндорфина и энкефалина регулируется независимо от их содержания в мозгу.

Характеристика β-эндорфиноподобного иммунореактивного материала. РИТ, используемый для измерения β-эндорфина, специфичен к участку Leu^{14}-His^{27} его молекулы [14]. Эта антисыворотка связывает в эквимолярном отношении β-эндорфин, β-ЛПГ и прогормон с мол. массой 31 000 дальтон (31К-предшественник), который выделен из клеток опухоли гипофиза и содержит, как показано, и АКТГ, и β-ЛПГ [29]. В связи с этим были предприняты попытки разделить иммунореактивные β-эндорфиноподобные компоненты с помощью гель-фильтрации. Экстракты мозга пропускали через колонку с биогелем Р60 и элюировали 4 М гуанидином. В результате с помощью РИТ на β-эндорфин было получено 2 пика иммунореактивности. Один пик в тсчности совпадает с положением меченного радиоактивным изотопом синтетического β-эндорфина, а второй пик (включающий в себя до 37% общего β-эндорфиноподобного иммунореактивного материала) элюируется в широкой зоне, соответствующей материалу с более высокой мол. массой (10—30 000), который не совпадает точно с профилем элюции ни β-ЛПГ, ни прогормона с мол. массой 31 000. Кроме того, β-эндорфиноподобное иммунореактивное вещество, соответствующее меченому β-эндорфину, (63% общего иммунореактивного материала) четко отделяется от пика энкефалина, обнаруживаемого с помощью радиоиммунологического теста на энкефалин.

Полосатое тело и кора мозга, мозжечка и гиппокампа характеризуются значительным содержанием веществ с более высокой молекулярной массой (табл. 1). В гипоталамусе, перегородке, варолиевом мосту, продолговатом и среднем мозгу фракция общего β-эндорфиноподобного иммунореактивного материала, образованная соединениями более высокой молекулярной массы, оказывается значительно меньше. Следовательно, материал, присутствующий в экстрактах мозга из некортикальных участков, скорее всего идентичен β-эндорфину. Однако значения, полученные при радиоиммунологических определениях β-эндорфина в экстрактах полосатого тела и кортикальных участков, оказываются обусловленными пока еще не охарактеризованными перекрестно реагирующими более крупными молекулами, которые, возможно, являются (но, может быть, и нет) либо β-ЛПГ [25], либо общим 31К-предшественником АКТГ и β-ЛПГ. Более того, при иммуноцитохимическом анализе некоторые из наших антисывороток к β-эндорфину (RB100-10/76 и RB 263-11/76) могут окрашивать миелинизированные волокна, особенно в кортикальных участках (коры мозга, гиппокампа и мозжечка). С помощью радиоиммунологического анализа мы определили степень перекрестной реактивности с очищенным основным миелиновым белком (мол. масса 18 500), которая оказалась равной 0,001% при расчете в молярных концентрациях. Можно думать, что в экстрактах мозга, используемых здесь для определения β-эндорфина, содержатся большие количества основного миелинового белка. Эти молекулы, следовательно, могут служить другим возможным источником перекрестно реагирующих молекул большей молекулярной массы, отделяемых гель-фильтрацией.

Содержание β-эндорфина и энкефалина в различных участках мозга. Когда в значения, полученные при радиоиммунологическом исследовании экстрактов всех участков мозга, вводят поправку на неохарактеризованный, высокомолекулярный материал, количества β-эндорфина, обнаруживаемые в целом мозгу, в гипоталамусе и среднем мозгу, оказываются значительными. Однако в экстрактах богатого энкефалином неостриатума (скорлупа/хвостатое ядро — бледный шар) или в коре мозга, мозжечка или гиппокампа никакого материала, соответствующего специфическому β-эндорфиновому компоненту, не обнаружено. Высокое содержание энкефалина в этих последних участках было установлено другими авторами [9, 13, 19, 21, 37, 46] и нашло подтверждение в наших радиоиммунологических тестах на энкефалин. Когда одни и те же участки анализируют на содержание β-эндорфина и энкефалина, то выявляются четкие независимые вариации от участка к участку этих двух классов опиоидных пептидов. Далее, при рассечении промежуточного мозга в соответствии с распределением иммуногистохимически обнаруживаемых β-эндорфиновых нейронов и волокон (см. ниже) соотношение между значениями β-эндорфина и энкефалина варьирует от 1,6 в гипоталамусе до 9,1 в периаквেдуктальном таламусе (табл. 2). Кроме того, бледный шар и хвостатое ядро, содержащие большое количество выявляемых иммуногистохимических энкефалиновых волокон, практически не содержат β-эндорфина (табл. 1). Следовательно, эти данные убедительно говорят о том, что β-эндорфин и энкефалин обнаруживаются в мозгу в различных нейронных системах.

Таблица 2

Распределение опиоидных пептидов в промежуточном мозге1)

	Вес ткани, мг	Содержание β-эндорфина (β-энд), нг/г	Содержание энкефалина (энк), ед. энк/г	Отношение β-энд/энк
Таламус	55	329±19	36±5	9,1
Дорсальная преоптическая область	35	742±156	140±22	5,2
Вентральная преоптическая область	57	987±127	260±31	3,8
Гипоталамус	31	217±32	134±17	1,6

1) Данные представлены как средние значения±средняя ошибка для мозга 12 крыс, который был рассечен на квадранты промежуточного мозга, как описано в другой статье [34].

Методы экстрагирования и фиксации ткани. Как показано более детально в других работах, методы стабилизации пептидов мозга после наступления смерти и экстрагирование их для РИТ являются критическими этапами при их количественном определении (см. также работы [6, 46]). Используя описанные выше

РИТ, мы оценили различные методы стабилизации и экстрагирования тканей. Как уже показано другими авторами [31], энкефалины оказываются очень нестабильными в гомогенатах ткани или в плазме; β-эндорфин же, наоборот, весьма стабилен в плазме крыс и не претерпевает заметной деградации в сыворотке, разведенной 1 : 10 и инкубированной более 30 мин при 37 °С [33]. Аналогично повторными пункциями спинномозговой жидкости in vivo у свободно перемещающихся макаков-резусов после инъекции β-эндорфина в желудочек мозга выявляется низкая скорость исчезновения пептида — около 50% в час (Оммайя, Блюм, Росье и Гуиллемин, неопубликованные данные). Однако при инкубации с гомогенатом мозга β-эндорфин исчезает быстрее; при инкубации 1 мкг синтетического пептида с 40 мг гомогената мозга при 37 °С время полужизни β-эндорфина составляет примерно 4 мин. Исчезновение β-эндорфина сопровождается одновременным появлением α-эндорфина [33].

Для инактивации пептидаз, к которым чувствительны энкефалины и β-эндорфин, мы сравнили температурную инактивацию при микроволновом облучении (1330 В, 45 Гц. General Medical Engineering Corp., Peabody, MA) с прямым погружением в нагретый раствор, используемый для экстрагирования. Предварительные сравнения показали, что наиболее эффективное экстрагирование достигается при использовании 1,0 н. уксусной кислоты (полная экстракция добавленного β-эндорфина) и что этот раствор имеет преимущества и при экстрагировании энкефалинов. Мы обнаружили, что забой животных путем микроволнового облучения в нашем случае не обеспечивает хорошей воспроизводимости от животного к животному, не обеспечивает он и генерализованной термоинактивации пептидаз вдоль всего участка, выбранного нами для анализа. Так, при использовании крыс весом боле 100 г оказывается трудно облучать гипофиз и мозжечок, не разрушая при этом промежуточного мозга. Однако мы учитывали следующие обстоятельства: во-первых, пептиды становятся чувствительными к расщеплению пептидазами только после гомогенизации ткани и, во-вторых, пептиды термостабильны, тогда как активность пептидаз обнаруживает различную степень термолабильности. Следовательно, подвергнув кипячению целый мозг или интактные вырезанные участки мозга, можно инактивировать пептидазы и уже потом осуществлять гомогенизацию и экстрагирование.

В связи с этим мы заключили, что для этих определений предпочтение следует отдавать кипячению. В настоящее время используется следующий метод. Животных забивают декапитацией, мозг быстро вынимают, разделяют на несколько кусочков и помещают в стеклянную тест-пробирку, содержащую 16 мл 1 н. уксусной кислоты, предварительно прогретой до 98 °С на кипящей водяной бане. Через 15 мин препараты ткани охлаждают в ледяной бане перед гомогенизацией и последующими процедурами. Этот метод дает значительно более воспроизводимые результаты по сравнению с микроволновым умерщвлением как в отношении эндорфинов, так и в отношении энкефалинов. При сравнении с результатами, полученными при декапитации, но без последующего кипячения, оказывается, что термоинактивация пептидаз — процедура, абсолютно необходимая для определения β-эндорфина. В некипяченых препаратах содержание β-эндорфина оказывается в 10 раз ниже. В случае энкефалинов такие резкие различия не обнаруживаются; в некипяченых препаратах содержание энкефалинов снижается всего в 2 раза. Интересно также, что при использовании кипячения иммунореактивность α-эндорфина оказывается ниже предела чувствительности метода определения. Этот результат может указывать на то, что α-эндорфин не является первичным соединением в мозгу крыс и возникает главным образом благодаря деградации β-эндорфина после гомогенизации ткани [33].

Иммуноцитохимические исследования

Методы. Результаты иммуногистохимического анализа с использованием антиэнкефалиновых сывороток были доложены несколькими лабораториями [9, 19, 38] (Уотсон и Акил, личное сообщение; Миллер и Стумпф, личное сообщение). Эти результаты показали, что фиксация формальдегидом и непрямая иммуноцитохимия криостатных срезов представляют собой приемлемую отправную точку при иммуноцитохимическом обнаружении этих пептидов. С появлением анти-β-эндорфиновых сывороток, обладающих заметной иммунореактивностью в РИТ, мы исследовали несколько сывороток и несколько методологических модификаций. Из шести имеющихся у нас антиэндорфиновых сывороток мы обнаружили хорошую иммунореактивность в гипофизе, мозге и кишечнике только для двух (RB100-10/76 и RB 263-11/76). Остальные сыворотки обладали реактивностью в РИТ, но давали очень слабое, или негативное, иммуноцитохимическое окрашивание. Среди различных методов фиксации мы практически обнаружили, что оптимальные результаты дает 5-минутная перфузия охлажденным до температуры льда 4—5%-ным деполимеризованным формальдегидом в 0,15 М фосфатном буфере с последующим погружением на 3 ч полосок мозга в тот же фиксатор. Более высокие и более низкие концентрации формальдегида или добавление 1% или более глутаральдегида приводили к неудовлетворительным результатам, равно как и получение срезов всех тканей после заключения в парафин. В каждом описанном ниже случае термин «положительная иммунореактивность» означает, что добавление 1 мкг синтетического β-эндорфина (RB100, разведенная в соотношении 1 : 1000 или 1 : 500) на 24 ч при 5°C блокирует все окрашивание, наблюдаемое на серийных срезах того же мозга, взаимодействующих с той же самой незаблокированной сывороткой. Ограниченное число сравнений было проведено с антисывороткой против лей-энкефалина, предоставленной доктором Р. Дж. Миллером (Burroughs-Welcome, Research Triangle, N. C.) Для удобства фотографирования и в целях максимального использования антисыворотки мы предпочли пероксидазно-антипероксидазный метод (ПАП-метод), предложенный Стернбергером [39] вместо конъюгированных с флуоренилизотиоцианатом антител козы к иммуноглобулинам кролика.

В соответствии с принятой нами методикой мы промывали полоски ткани возрастающими концентрациями забуференного раствора сахарозы и хранили в 18%-ном растворе сахарозы вплоть до получения срезов на криостате Харриса при температуре от —18 до —20°С. Срезы толщиной 10—20 мкм оттаивали на покрытом желатиной предметном стекле, высушивали на воздухе и экспонировали с сывороткой, разведенной фосфатно-солевым буферным раствором и содержащей бычий сывороточный альбумин в концентрации 1 мг/мл и 0,001% тритона Х-100 [1]. Срезы ткани максимально сохраняли целостность клеток и проявляли высокую иммунореактивность при инкубации с разведенной первичной антисывороткой (1 : 500 до 1 : 1500) при 4°С в течение 24—48 ч. Дальнейшие манипуляции при комнатной температуре включали в себя многократное промывание фосфатно-солевым буфером, антисывороткой козы к иммуноглобулинам кролика и ПАП, связанной с кроличьим IgG и, наконец, выявление пероксидазного маркера с помощью диаминобензидина в соответствии со стандартными методами.

Особенности окрашивания. Результаты, полученные с помощью иммунопероксидазного метода при исследовании гипофиза крыс, свиней, лягушек и мышей, сравнимы с результатами, полученными ранее при использовании флуоренилизотиоцианата [1]. Все клетки интермедиальной доли и кортикотропные клетки аденогипофиза дают положительную реакцию на β-эндорфин, и на срезах можно видеть четко выраженные внутриклеточные гранулы (рис. 1). При использовании антисыворотки к лей-энкефалину, полученной от Миллера, мы обнаружили только слабое окрашивание интермедиальной доли, но заметное волокноподобное окрашивание в нейрогипофизе (готовится к печати).

В мозге β-эндорфин-реактивные элементы ткани гораздо более ограничены, чем элементы, взаимодействующие с энкефалиновой антисывороткой. Видны две группы β-эндорфин-реактивных нейронов (рис. 2). Обе группы локализованы в базальном гипоталамусе: одна — внутри дорсолатеральнее аркуатного ядра в его трети, простирающейся от середины до задней части, и вторая несколько более кпереди и заметно сбоку в базальном гипоталамусе. Некоторые клетки образуют непрерывную линию через основание третьего желудочка.

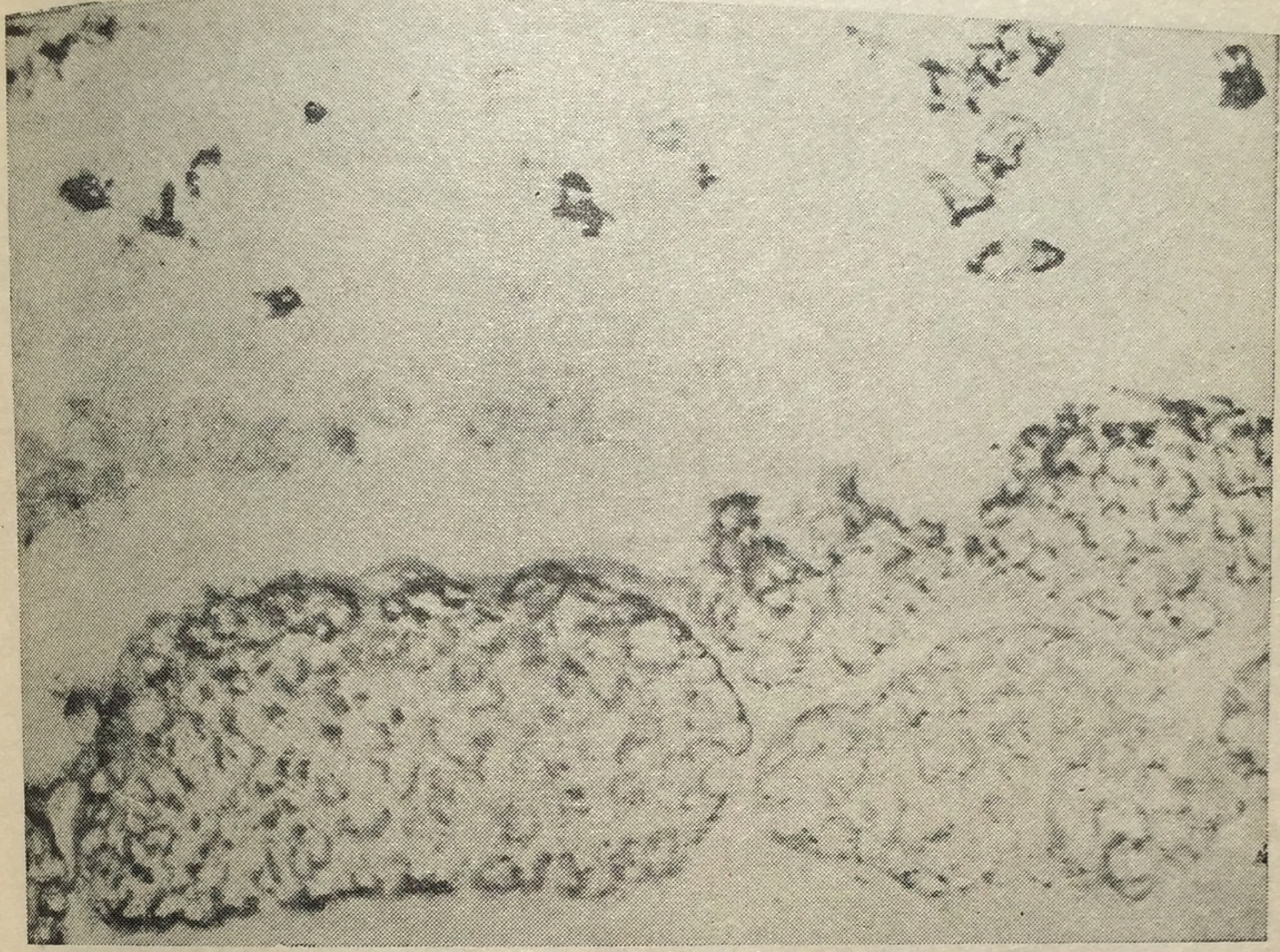


Рис. 1. Иммунопероксидазная локализация β-эндорфина в гипофизе крысы; окрашены все клетки промежуточной доли и лишь отдельные кортикотрофные клетки в аденогипофизе.

Большие длинные и толстые варикозные отростки видны внутри этих ядер и могут быть прослежены на серийных срезах через промежуточный и средний мозг. Эти варикозные волокна большей частью приурочены к структурам средней линии вблизи поверхности желудочка, хотя имеются некоторые исключения.

Волокна имеют наибольшую плотность в передней области гипоталамуса, особенно на уровне перекреста переднего отдела спайки и внутри концевой полоски, и несколько меньшую плотность в латеральной перегородке и в аккумбентном ядре. Внутри собственно гипоталамуса — паравентрикулярного, супраоптического и супрахиазматического ядер — наблюдается иннервация умеренной плотности, равно как в латеральном гипоталамическом участке переднего гипоталамуса и срединном возвышении. Структуры средней линии внутри таламуса и периакведуктального серого вещества моста обнаруживают заметную иннервацию, особенно переднее паравентрикулярное ядро (рис. 3), dorsal raphe и locus coeruleus, в точке которых волокна латерально исчезают. Кзади от locus coeruleus волокна, реактивные на β-эндорфин, чрезвычайно редки.

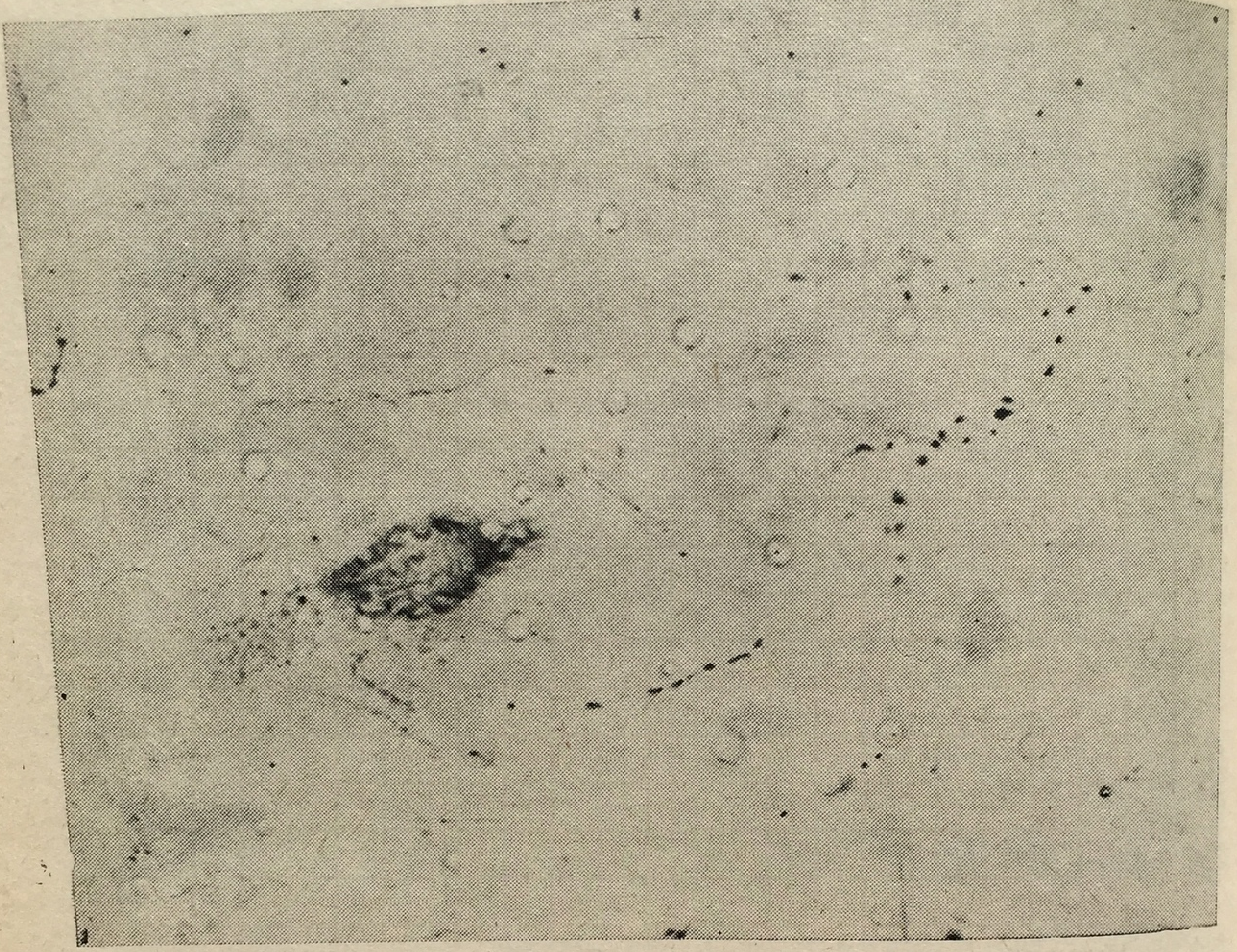


Рис. 2. Иммунопероксидазное окрашивание β-эндорфина в нейронах и отростках нейронов базально-бугорчатого гипоталамуса крысы.

Положительная реактивность наблюдалась и в том случае, когда сыворотку RB263 очищали аффинной хроматографией с использованием геля, конъюгированного с синтетическим β-эндорфином (1,7 мг на 1 мл сефарозы). Полученная антисыворотка обладала более низким титром в РИТ, чем сыворотка RB100, но обладала высоким сродством к β-эндорфину. При использовании в иммуноцитохимическом анализе эта сыворотка давала те же результаты, что и описанные выше, но, кроме того, выявлялась интенсивная окраска миелинизированных аксонов, которая была наиболее заметна в препириформной коре, в коре обонятельного мозга, гиппокампе, лимбической коре и внутри поясовидной извилины и мозжечка (рис. 4). Эта реактивность полностью подавлялась предварительной инкубацией сыворотки с β-эндорфином; в случае предварительной инкубации сыворотки с хорошо очищенным основным миелиновым белком подавлялась только реактивность миелинизированных волокон; окрашивание препарата было таким же, как и при использовании сыворотки RB100. Эти наблюдения в сочетании с результатами иммунологического анализа материала, разделяемого при гель-фильтрации, свидетельствует о существовании общего реактивного компонента у иммуногенных участков β-эндорфина и основного миелинового белка. Эта неожиданная общая для обоих пептидов последовательность и перекрестная реактивность могут служить источником ошибок при картировании и определении содержания. К счастью, реактивностью к β-эндорфиновой антисыворотке обладают не все миелинизированные тракты, а главным образом миелинизированные волокна в участках лимбической коры. При использовании в более высоких концентрациях, особенно в случае мозга неполовозрелых животных, сыворотка RB100 также может вызывать окрашивание некоторых миелинизированных волокон. Тем не менее, несмотря на кажущуюся регионарную избирательность перекрестной реактивности миелина, мы полагаем, что это не имеет функциональной значимости, за исключением тех случаев, когда возникает необходимость точного определения β-эндорфина.

При сравнении с известным распределением и появлением энкефалин-реактивных отростков нейронов становится ясно, что они образованы различными наборами участков-мишеней с некоторым

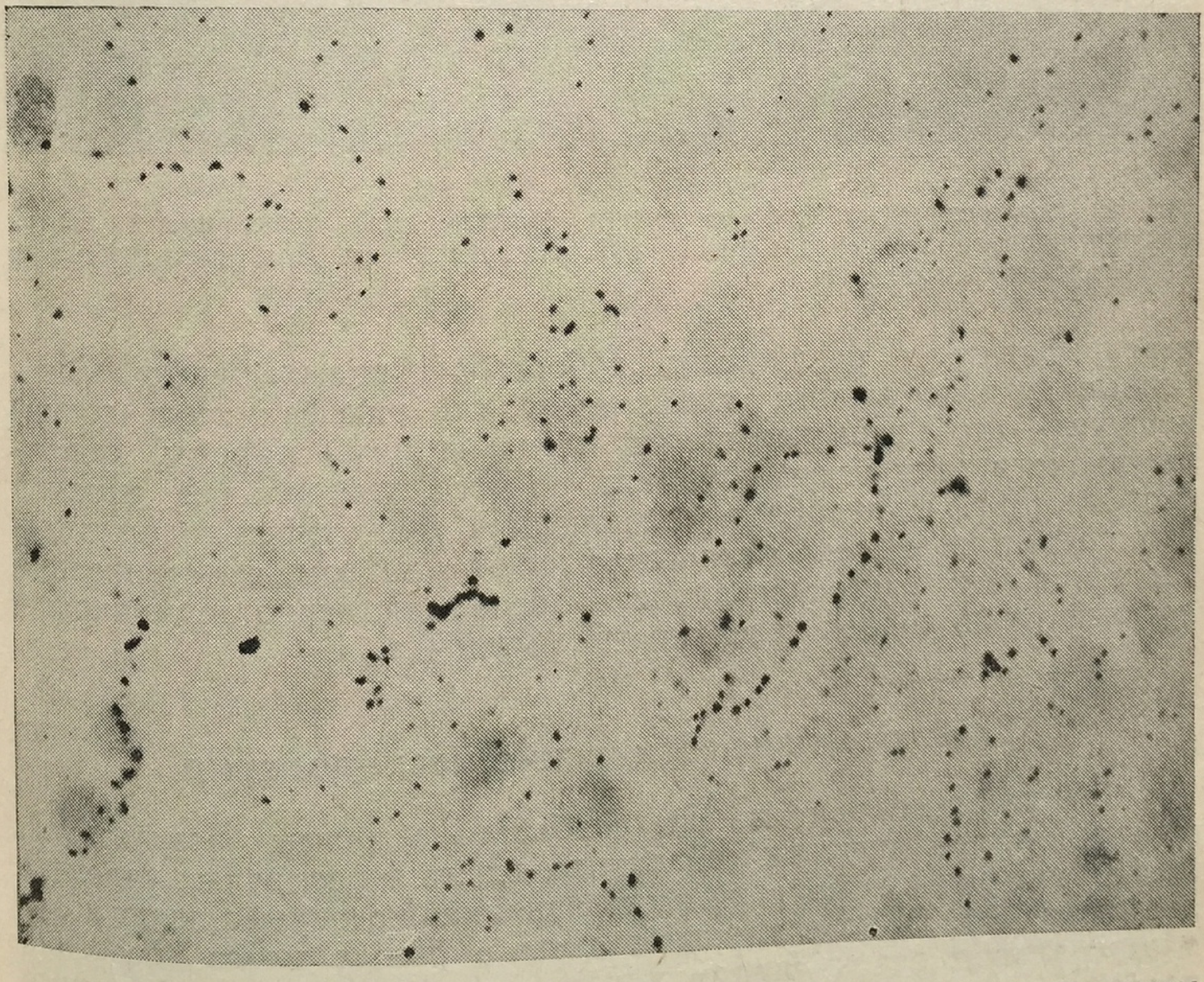


Рис. 3. Иммунопероксидазное окрашивание β-эндорфина в периакведуктальном сером веществе (переднее паравентрикулярное ядро) крысы.

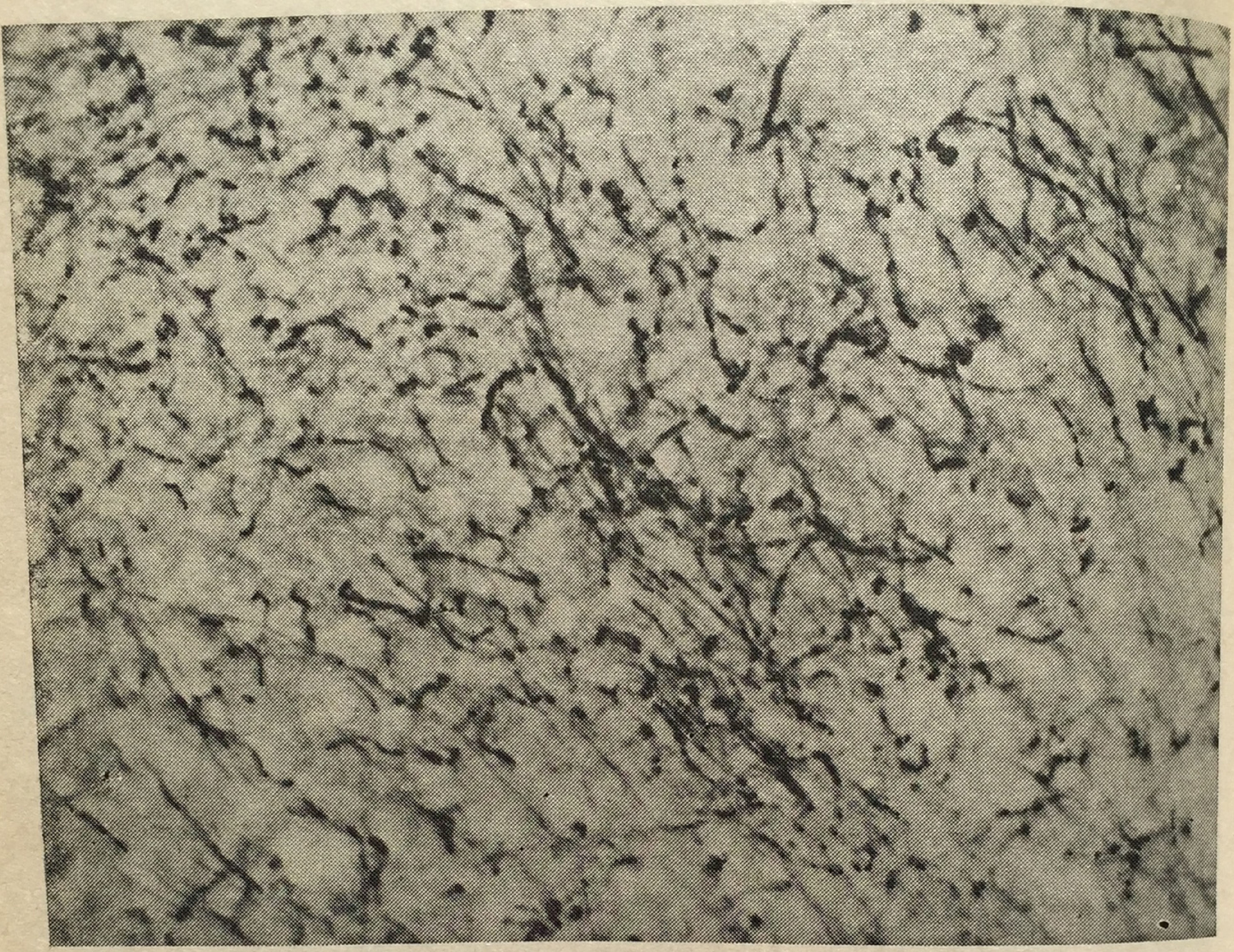


Рис. 4. Иммунопероксидазное выявление перекрестной реактивности внутри миелинизированных аксонов в поясничной извилине крысы. Для более детального ознакомления см. текст.

перекрыванием и различными наборами нервных клеток. Полученные недавно данные показывают, что энкефалинсодержащие нейроны — это преимущественно короткие интернейроны, присутствующие в дискретных участках по всей центральной нервной системе [19]. И наоборот, локализация β-эндорфин-положительных клеток ограничена базальным гипоталамусом, а локализация отростков этих клеток ограничена преимущественно терминалями средней линии вблизи поверхности желудочка.

Электрофизиологические исследования

Сравнительно недавно мы сообщили о наших результатах, полученных при изучении нейронного ответа в различных участках мозга крыс на ионофоретическую аппликацию энкефалинов и эндорфинов [9]. В коре головного мозга, стволе мозга (особенно в латеральном ретикулярном ядре), хвостатом ядре и таламусе наиболее активные клетки подавлялись опиатами и всеми упомянутыми пептидами. Наоборот, пирамидальные клетки исключительно возбуждались опиатами и пептидами. Более низкая степень чувствительности со смешанным возбуждением и торможением обнаруживалась в клетках Пуркинье мозжечка. В каждом испытанном участке и возбуждающий, и тормозящий эффекты подавлялись при ионофоретическом или парэнтеральном введении налоксона.

Более поздние исследования были сфокусированы на неожиданном возбуждении, обнаруженном в гиппокампе [2]. Принимая во внимание установленный факт холинэргического возбуждающего входа в гиппокамп из перегородки, мы оценивали эффекты пептидов и ацетилхолина в присутствии налоксона и холинэргических антагонистов. Однако холинэргические антагонисты не оказывали действия на возбуждение, вызываемое опиоидными пептидами, и налоксон, наоборот, не оказывал влияния на возбуждение ацетилхолином. Этот интересный случай возбуждения в настоящее время является объектом дальнейших исследований как попытка оценить сравнительную эффективность энкефалинов и эндорфинов, основанную на региональном и цитохимическом распределении пептидов.

ДЕЙСТВИЕ ЭНДОРФИНОВ НА ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММУ

Опиоидные алкалоиды вызывают изменения спонтанных электроэнцефалограмм (ЭЭГ) при системном введении человеку или внутримозговом введении экспериментальным животным [40]. При системном введении высоких доз этих агентов или при введении в определенные внутримозговые участки эти агенты могут усиливать эпилептоморфную активность [10, 40, 42, 44, 45]. Мы обнаружили недавно [18], что эндорфины также являются мощными эпилептогенными агентами при внутрижелудочковом введении крысам и могут вызывать аналогичные эффекты на ЭЭГ в молярных дозах, значительно меньших, чем соответствующие по эффекту дозы опиатных алкалоидов. В наших опытах β-эндорфин оказался наиболее эффективным и долгодействующим эпилептогенным агентом, что согласуется с его кажущейся эффективностью в индукции других поведенческих признаков [3, 7, 22, 29, 35, 41]. Оказалось, что мет-энкефалин также способен вызывать сходные электроэнцефалографические изменения, но делает это только при значительно более высоких молярных дозах и, кроме того, только на более короткий период времени [42]. Однако различия в кажущейся эффективности мет-энкефалина и β-эндорфина могут быть обусловлены известной повышенной чувствительностью пентапептида к протеолитическому расщеплению. В связи с обсуждавшимися ранее кажущимися различиями в распределении β-эндорфина и энкефалинов определение первичного участка действия этих пептидов при вышеупомянутых эффектах приобретает критическое значение.

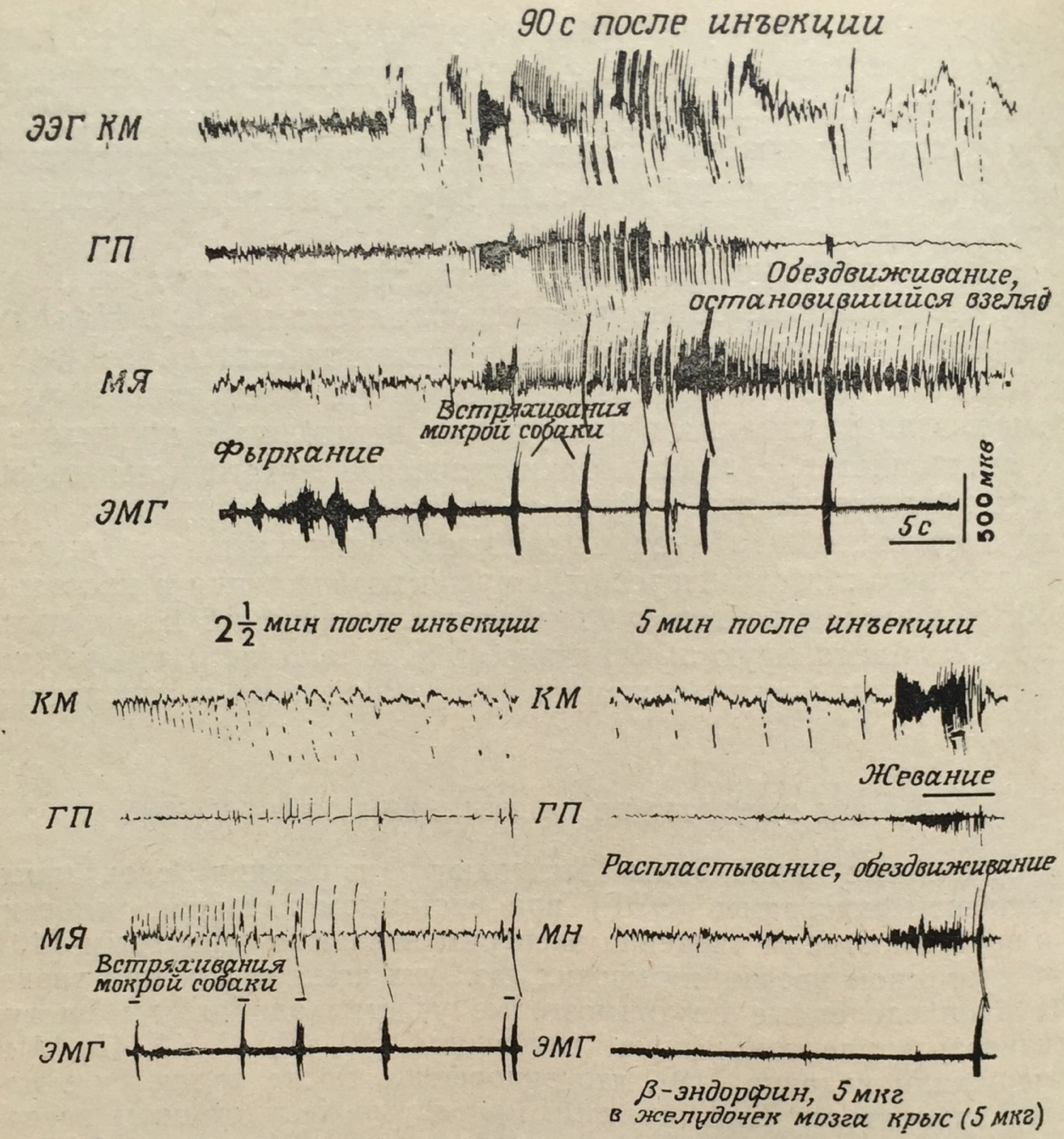


Рис. 5. Электроэнцефалографическая запись через 90 с, 2,5 мин и 5 мин после инъекции β-эндорфина (5 мкг в желудочек мозга); водители электроэнцефалограммы в коре мозга (КМ), гиппокампе (ГП), миндалевидном ядре (МЯ). Кроме того, приведена электромиограмма (ЭМГ) шейной мышцы. Видны заметные приступные разряды, как отмечено в тексте.

Рис. 5 иллюстрирует характерный пример типа изменений в ЭЭГ, наблюдаемых после внутрижелудочкового введения 5 мкг β-эндорфина. У крыс с хронически имплантированными кортикально и субкортикально наборами электродов эпилептообразный разряд появляется примерно через 90 с после инфузии (10 мкл в течение 20—30 с). Неожиданно появляющемуся эпилептоморфному разряду часто предшествует исследовательское поведение и энергичное фырканье. В течение начальной фазы эпизода крысы кажутся настороженными, но неподвижными и могут проявлять случайный обонятельный или вкусовой стереотип. Зачастую при прекращении начального эпизода у животных проявляется симптом «встряхивания мокрой собаки». В зависимости от дозы могут наблюдаться также многочисленные приступные эпизоды, каждый из которых сопровождается длительным периодом межприступных спайков, продолжающимся вплоть до четырех часов при высоких диапазонах доз. Особый интерес представляет тот факт, что при низких дозах единственным явным поведенческим эффектом оказывается ускорение развития приступных реакций, являющееся, по-видимому, наиболее низким пороговым эффектом β-эндорфина. Этот эффект может проявляться у крыс, не обнаруживающих любых других поведенческих реакций, включая кататонию, потерю роговичного рефлекса или анальгезию, наблюдаемых при более высоких дозах и обсуждаемых ниже более детально.

Хотя электрографически наблюдаемые приступы ускоряются β-эндорфином, мы никогда не наблюдали судорог вслед за острым или хроническим введением. Приступная реакция кажется первично локализованной в лимбической системе и не распространяется, по-видимому, в моторную систему. Повторные инъекции β-эндорфина приводят к ослаблению эпилептического ответа, что, по-видимому, свидетельствует о развитии толерантности. При более высоких дозах β-эндорфина, когда ригидность становится заметной, на электроэнцефалограммах обнаруживается кортикальная синхронность и активность медленной волны, равно как и межприступные спайки. Эта синхронная активность может быть десинхронизирована минимально возбуждающими стимулами любой модальности, но нечувствительна к ноцицептивным стимулам.

В целом электрографический ответ может быть обращен или блокирован введением специфического опиатного антагониста налоксона (2—5 мг/кг, внутрибрюшинно) до появления разрядов или вслед за ним.

Поведенческие эффекты эндорфинов и их приложение к человеку

Недавно мы сообщали о том, что внутрижелудочковое введение β-эндорфина, но не других природных опиатоподобных нейропептидов, индуцирует у крыс выраженное состояние иммобилизации, характеризующееся отсутствием движения, утратой рефлекса вставания и чрезвычайной генерализованной ригидностью мышц [3]. Аналогичные результаты были получены впоследствии другими авторами [22, 29]. Однако Джекет и Маркс [23] сообщили, что введение β-эндорфина в периакведуктальное серое вещество (ПСВ) вызывает «каталептоподобное» состояние; они выдвинули предположение о том, что опиоидные пептиды могут рассматриваться как «природные нейролептики». Поскольку это предположение диаметрально противоположно нашей интерпретации, были предприняты дополнителные эксперименты [35].

Животных помещали по отдельности в камеры для наблюдения (54×32×15 см) примерно за 30 мин до инъекции и затем проводили тест на ригидность, неподвижность на вертикальной решетке и рефлекс вставания каждые 15—30 мин в течение 1—4 ч. Ригидность оценивали с помощью трех тестов: 1) субъективная оценка при ощупывании животных, 2) ригидность туловища и 3) мостиковый тест [3]. Измерение на вертикальной решетке было единственным тестом из обычно используемых для характеристики каталепсии [11], позволяющих отличить поведенческую иммобилизацию, связанную с ригидностью или вялостью от каталепсии, индуцированной нейролептическими средствами. Рефлекс вставания оценивали, исходя из его способности сохраняться после индуцированной нейролептическими средствами каталепсии, но не после состояний иммобилизации, индуцированной другими препаратами [11]. Помимо этих тестов животные постоянно обследовались на общие поведенческие и физиологические изменения.

Анализы зависимости доза — ответ для β-эндорфина и галоперидола выявили значительные различия в соответствующих поведенческих реакциях (табл. 3). В течение 30 мин после инъекции большинство крыс отвечает на β-эндорфин кратковременным периодом «встряхивания мокрой собаки», за которым следует общая мышечная ригидность (сопровождаемая оцепенением хвоста) и неподвижность. Ригидность сохраняется в течение по крайней мере

Таблица 3

Поведенческие характеристики действия β-эндорфина и галоперидола[1]

Воздействие	Доза, мкг/10 мкл	Число животных	Ригидность	Тест на вертикальной решетке	Рефлекс вставания
Физиологический раствор		10		0	+
β-Эндорфин	5,0	12	1,5 0,3	С	—
	10,0	7	2,6 0,4	С	—
	25,0	4	3,4 0,4	С	—
	50,0	20	3,4 0,2	С	—
Физиологический раствор		10	0	0	+
Галоперидол	0,5	12	0	1,8 0,3	+
	1,0	12	0	2,9 0,1	+
	5,0	15	0	2,6 0,2	+
	4,0	10	0	2,5 0,2	+
	8,0	15	0	2,3 0,2	+
	12,0	6	0	2,6 0,2	+

[1] С — соскальзывание с сетки. Данные, представленные как среднее значение±средняя ошибка, указывают на эффекты, наблюдаемые через 1 ч после инъекции (более полное описание особенностей поведения можно найти в работе [36]).

4 ч после инъекции наиболе высоких доз (50 мкг). В течение нескольких минут после инъекции 5 мкг β-эндорфина животные обнаруживают заметную гиперактивность в сочетании с оральной стереотипией, периодически прерывающуюся эпизодами «встряхивания мокрой собаки» (более подробно см. [35]). При такой низкой дозе ригидность сохраняется в течение примерно 20 мин, после чего восстанавливается гиперактивность, но без симптома «встряхивания мокрой собаки». В течение периода ригидности (особенно вызванной более низкими дозами β-эндорфина: 5 и 10 мкг) крыс можно спровоцировать на движение с помощью умеренной звуковой, зрительной или тактильной стимуляции. Более того, интенсивность ригидности оказывается сниженной при тестировании в ночной период, когда крысы в норме более активны.

В отличие от β-эндорфина никакие дозы галоперидола не вызывают ригидности. В самом деле, при наиболее высоких дозах галоперидола (8 и 12 мг/кг) большинство крыс становится умеренно вялыми, особенно в течение 30 мин после инъекции. Эффекты β-эндорфина и галоперидола оказываются противоположными и в тесте на вертикальной решетке. Так, животные, получившие β-эндорфин, быстро спрыгивают с решетки до и после периода регидности и типично соскальзывают с решетки в течение фазы ригидности. В противоположность этому крысы, получавшие галоперидол, прочно ухватываются за решетку и остаются на ней в течение относительно долгого периода времени (по крайней мере 60 с). Кроме того, эти два вещества оказывают различное действие и на реакцию вставания: дозы β-эндорфина 5 мкг всегда подавляют этот рефлекс в течение фазы ригидности, тогда как после инъекции галоперидола в такой большой дозе, как 12 мг/кг, реакция вставания сохраняется. Более того, в отличие от того, что наблюдается в случае β-эндорфина, после инъекции галоперидола животные поддерживают сгорбленную позу с отведенными конечностями, отвечают голосовым сигналом на дотрагивание и часто мочатся, будучи помещенными на вертикальную решетку [35].

Различия между эффектами β-эндорфина и галоперидола обнаруживаются также при фармакологических исследованиях (табл. 4). Так, «встряхивание мокрой собаки», хотя и часто наблюдается, но, как правило, более задержано по сравнению со случаем внутрижелудочкового введения. Значение ригидности 2,2±0,2 (среднее±средняя ошибка) достигается с β-эндорфином в течение 30 мин после инъекции в периакведуктальное серое вещество (ПСВ). В течение фазы ригидности рефлекс вставания утрачивается, и крысы соскальзывают или спадают с решетки. Все эти эффекты обращаются в течение нескольких минут после подкожной инъекции налоксона (2 мг/кг). Хотя налоксон (2 мг/кг) не изменяет действия галоперидола, дозы налоксона, столь низкие, как 0,1 мг/кг, обращают, по-видимому, все эффекты β-эндорфина. При этой дозе налоксона восстановление оказывается преходящим

Таблица 4

Сравнение эффектов β-эндорфина (β-Э) и галоперидола (Г)

Предварительное воздействие	Воздействие	N	Ригидность	Тест на вертикальной решетке	Рефлекс вставания
—	Н (2 мг/кг)	4	0	0	+
	β=Э (50 мкг/10 мкл)	20	3,4±0,2	С	—
β-Э (50 мкг/10 мкл)	Н (0,1—2,0 мг/кг)	15	0	0	+
—	Г (2 мг/кг)	15	0	2,6±0,2	+
Г (2 мг/кг)	Н (2 мг/кг)	5	0	2,8±0,1	+
β-Э (50 мкг/10 мкл)	(2 мг/кг)	14	В	С	—
β-Э (50 мкг/10 мкл) +Г(2 мг/кг)	(2 мг/кг)	7	0	2,1±0,5	+

В — вялая. С — соскальзывает с решетки. Фармакологическое взаимодействие этих лекарственных веществ с налоксоном (Н) оценивали в тех же трех поведенческих тестах, какие указывались в табл. 3. Последовательные инъекции проводили с интервалом в 1 ч (более детальное описание методов см. в работе [35]). N — число подопытных животных.

и ригидность возобновляется через 30 мин после инъекции. Более того, животные, ставшие ригидными под действием β-эндорфина и позднее получившие инъекции галоперидола (2 мг/кг), становятся вялыми. У животных, ставших вялыми в результате такого комбинированного воздействия, введение налоксона (2 мг/кг) приводит к появлению типичного спектра всех эффектов галоперидола (табл. 4). Таким образом, налоксон, специфически противодействуя эффектам β-эндорфина, демаскирует поведенческие особенности, индуцированные галоперидолом.

Хотя внутрижелудочковое введение β-эндорфина приводит к состоянию неподвижности, которое можно легко отличить от каталептогенного действия галоперидола, поведенческие особенности, индуцированные β-эндорфином при внутрижелудочковом введении, могут отличаться от таковых при прямом внутримозговом введении или введении в ПСВ [23].

Чтобы проверить такую возможность, животным вводили билатерально либо физиологический раствор, либо 2—8 мкг β-эндорфина в ПСВ. Результаты выявили дозозависимый характер эффектов, аналогичных таковым при внутрижелудочковом введении β-эндорфина, причем наиболее эффективным участком ПСВ оказывается вентромедиальный участок, вслед за которым следует dorsal raphe, где выявляются эндорфиновые волокна (см. выше). Более того, в то время как β-эндорфин индуцирует «амфетаминоподобное» состояние гиперактивности до и (или) после фазы ригидности, ничего подобного не наблюдается после инъекции галоперидола. Таким образом, развернутое исследование поведенческих ответов на β-эндорфин не подтверждает предположения [23] о том, что этот опиатоподобный нейропептид может быть природным нейролептическим агентом, во всяком случае, насколько об этом можно судить по характеру поведенческих эффектов у крыс.

Наоборот, мы указывали уже, что способность β-эндорфина индуцировать у крыс поведенческие изменения, возможно, свидетельствует о том, что эти пептиды играют роль потенциальных экоэтиологических факторов при некоторых психических расстройствах [3]. Мы предположили далее, что если это верно, то опиатные антагонисты могут иметь некоторую терапевтическую ценность. Хотя одна группа исследователей [16] сообщала о том, что 0,4 мг налоксона снижали интенсивность слуховых галлюцинаций в 4 из 6 случаев хронической шизофрении, в работах других авторов [8, 43], а также в наших собственных исследованиях [24] с использованием в 2—3 раза более высоких доз и двойного слепого протокола не удалось воспроизвести этих положительных результатов с налоксоном. Однако, исходя из результатов проведенных нами поведенческих и электроэнцефалографических наблюдений и регистрации отдельных нейронов, можно думать, что эти дозы налоксона могут быть все же слишком малы для обращения центральных эффектов эндорфина. Более того, по субклассификации опиатных рецепторов, предложенной Мартином и сотр. [28, 30], действие некоторых опиатных агонистов требует для обращения в 3—6 раз больше налоксона. Совсем недавно Кляйн и Леман (частное сообщение) наблюдали немедленное кратковременное улучшение у больных с психической депрессией, удлинение латентности и удлинение улучшения в некоторых случаях хронической шизофрении после внутривенной инфузии β-эндорфина (общая доза 3—9 мг/6 ч). Эти предварительные клинические данные, на основании которых можно сделать вывод о положительном терапевтическом действии периферического эндорфина, трудно сопоставить с результатами исследований на животных, указывающими на минимальные преходящие центральные эффекты пептида только при чрезвычайно высоких периферических дозах.

Хотя из этих результатов неясно, где и как содержащиеся в крови эндорфины могут вызывать эффект, нормализующий поведение человека, можно думать, что значение пептидов в исследовании психических нарушений является плодотворной областью исследований, требующей специфических доказательств. Решающее значение приобретает, например, разработка радиоиммунологических тестов на эндорфины в плазме и спинномозговой жидкости человека и выяснение путей, по которым периферические пептиды могут оказывать свое предполагаемое центральное действие. Мы сообщили недавно [15], что каждый стресс, приводящий, как известно, к выделению АКТГ в кровь крыс, приводит также и к одновременому выделению β-эндорфина в эквимолярных количествах. Это одновременное выделение наиболее правдоподобно объяснить общим клеточным запасанием и синтезом двух пептидных гормонов, по-видимому, в результате их синтеза из одного и того же прогормона [29]. Поскольку периферические ткани-мишени отвечают на АКТГ секреторными продуктами, которые в свою очередь по принципу обратной связи регулируют высвобождение АКТГ, мы задались вопросом: существует ли аналогичная обратная связь для регуляции секреции эндорфинов? Такие периферические мишени могут включать в себя богатые эндорфином клетки желудочно-кишечного тракта или почти неизвестные циркумвентрикулярные органы, расположенные вокруг желудочков в глубине «карманов» (такие, как эпифиз, срединное возвышение, субкомиссуральный и субфорникальный органы), которые расположены на кровяной стороне гемато-энцефалического барьера. Если какие-либо из этих клеток могут отвечать на эндорфины крови, то сигналы по иннервирующим их нейронам будут передаваться к высшим нервным центрам.

В любом случае ценность таких спекуляций, хотя и интересных в настоящее время, наиболее основательно сможет быть оценена ретроспективно на следующем симпозиуме по эндорфинам.

* *
*

Мы благодарим доктора Дж. Гупта за предоставленный нам налоксон.

Список литературы

1. *Bloom F., Battenberg E. L. F., Rossier J., Ling N., Leppaluoto J. Vargo T. M., Guillemin R.* Life Sci., **20**, 43—48 (1977).
2. *Bloom F., Rossier J., Battenberg E., Vargo T., Minick S., Ling N., Guillemin R.* Neuroscience Abstracts (1977). In press.
3. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
4. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Sneell C. R., Birdsall N. J. M.. Hulme E. C.* Nature, **260**, 793—795 (1976).
5. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Wendlandt S.* Biophys. Biochem. Res. Commun., **74**, 748—754 (1977).
6. *Cheung A. L., Stavinoha W. B., Goldstein A.* Life Sci., **20**, 1285—1290 (1977).
7. *Cox B. M., Goldstein A., Li C. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1821—1823 (1976).
8. *Davis G. C., Bunney W. E., Jr., deFraites E. G., Kleinman J. E., Van Kammen D. P., Post R.* Science, **197**, 74—76.
9. *Elde R., Hokfelt T., Johannsson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
10. *Flor-Henry P.* Epilepsia, **10**, 363—395 (1969).
11. *Fog R.* Acta Neurol. Scand. Suppl., **50**, 11—66 (1972).
12. *French E., Siggins G. R.* Neuroscience Abstracts (1977). In press.
13. *Goldstein A.* Science, **193**, 377—383 (1976).

14. *Guillemin R., Ling N., Vargo T.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**, 361—366 (1977).
15. *Guillemin R., Vargo T., Rossier J., Minick S., Ling N., Rivier C., Bloom F.* Science, **197**, 1368—1369 (1977).
16. *Gunne L.-M., Lindstrom L., Terenius L.* J. Neural Transmission, **40**, 13—18 (1977).
17. *Hambrook J. M., Morgan B. A., Rance M. J., Smith C. F. C.* Nature, **262**, 782—783 (1976).
18. *Henriksen S. J., Bloom F. E., Ling N., Guilemin R.* Neuroscience Abstracts (1977). In press.
19. *Hokflet T., Elde R., Johansson O.. Terenius L., Stein L.* Neuroscience Letters, **5**, 25—31 (1977).
20. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
21. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—580 (1975).
22. *Izumi K., Motomatsu T., Chretien M., Butterworth R. F., Lis M., Seidah N., Barbeau A.* Life Sci., **20**, 1149—1154 (1977).
23. *Jacquet Y. F., Marks N.* Science, **194**, 632—635 (1976).
24. *Janowsky D. S., Segal D. S., Bloom F., Abrams A., Guillemin R.* Am. J. Psychiatry, **134**, 926—927 (1977).
25. *Krieger D. T., Liotta A., Suda T., Palkovits M., Brownstein M.* J. Biochem. Biophys. Res. Commun., **76**, 930—936 (1977).
26. *Lazarus L. H., Ling N., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 2156—2159 (1976).
27. *Ling N., Burgus R., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3308—3310 (1976).
28. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, **267**, 495—499 (1977).
29. *Mains R. E., Eipper B. A., Ling N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1977). In press.
30. *Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E. Gilbert P. E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **197**, 517—532 (1976).
31. *Meek J. L., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 151—154 (1977).
32. *Nicoll R. A., Siggins G. R., Ling N., Bloom F. E., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 2584—2588 (1977).
33. *Rossier J., Bayon A., Vargo T., Ling N., Guillemin R., Bloom F. E.* Life Sci. (1977). In press.
34. *Rossier J., Vargo T., Minick S., Ling N., Bloom F. E., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1977). In press.
35. *Segal D. S., Browne R. G., Bloom F., Ling N., Guillemin R.* Science (1977). In press.
36. *Simantov R., Goodman R., Aposhian D., Snyder S. H.* Brain Res., **111**, 204—211 (1976).
37. *Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R.. Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 2167—2171 (1977).
38. *Simantov R., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 2515—2519 (1976).
39. *Sternberger L. A.* In: Peptides in Neurobiology, ed. H. Gainer, pp. 61—98, Plenum Press, New York (1977).
40. *Teitelbaum H., Blosser J., Catravas G.* Nature, **260**, 158—159 (1976).
41. *Tseng L. F., Loh H. H., Li C. H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 390—393 (1977).
42. *Urca G., Frenk H., Liebeskind J.* Science, **197**, 83—86 (1977).
43. *Volavka J., Mallya A., Baig S., Perez-Cruet J.* Science, **196**, 1227—1228 (1977).
44. *Volavka J., Zads A., Roubicer S., Fink M.* Neuropharmacology, **9**, 587—593 (1970).
45. *Wikler A.* J. Nerv. Ment. Dis., **120**, 157—175 (1954).
46 *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).

НЕЙРОНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭНКЕФАЛИН И ВЕЩЕСТВО Р В ТРОЙНИЧНОЙ И ЭКСТРАПИРАМИДНОЙ СИСТЕМАХ

А. К. КУЕЛЛО

(A. C. Cuello)

Применение иммуноцитохимического метода к изучению распределения в клетках вновь открытых пептидов мозга показало, что волокна, иммунореактивные по веществу Р и энкефалину, сосуществуют во многих участках мозга [1, 2, 7, 11, 13, 26, 29]. Многие из этих участков, несомненно, связаны с механизмами восприятия боли — например, система тройничного нерва. Вещество Р и энкефалин содержатся также и в отделах мозга, не участвующих непосредственно в восприятии боли, таких, как экстрапирамидная система. В данной статье мы приводим результаты некоторых экспериментальных исследований организации и участков исхода этих пептидэргических нейронов в тройничной и экстрапирамидной системах. Эти исследования проведены в содружестве с доктором М. Дель-Фиаццо из Университета Каглиари (Сардиния, Италия) и доктором Ж. Дж. Паксинос из Университета Нового Южного Уэльса (Австралия).

Методы

ИММУНОЦИТОХИМИЯ

Контрольных и имеющих повреждения взрослых самцов крыс (Вистар, 200—300 г) анестезировали эквитезином (250 мкл/100 г) и перфузировали внутрисердечно холодным 4%-ным параформальдегидом в 0,1 М фосфатом буферном растворе, pH 7,4, в течение 15—30 мин. Мозг удаляли и помещали в такой же фиксирующий раствор еще на 2—4 ч. Фиксированные образцы ткани переносились в холодный 0,1 М фосфатный буфер, содержащий 5% сахарозы, и инкубировали в течение 5 суток. Срезы толщиной 10 мкм получали на криостате Брайта при —20°С. Соседние срезы использовали для иммуноцитохимического определения и окраски по Нисслю. Иммуноцитохимическое выявление вещества Р и энкефалинов проводили, используя либо отдельный мозг для каждого определения, либо соседние срезы одного и того же мозга.

Антисыворотку к веществу Р получали от морских свинок после повторных подкожных инъекций конъюгата вещества Р с бычьим сывороточным альбумином. При радиоиммунологическом тестировании эта антисыворотка не проявляла перекрестной реактивности с родственными пептидами — эледоизином и физалеимином — при их молярном избытке вплоть до 1000-кратного. Кроличью антисыворотку к лей-энкефалину получали от д-ра Миллера (Burroughs Wellcome, Северная Каролина). Используя эту же сыворотку в радиоиммунологическом тестировании, доктор Миллер обнаруживал микромолярные количества лей-энкефалина. Эта лей-энкефалиновая антисыворотка не проявляла перекрестной реактивности с β-липотропином и АКТГ, а ее перекрестная реактивность с мет-энкефалином и β-эндорфином составляла соответственно 1 и 0,01%. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с помощью конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом антител против иммуноглобулинов морской свинки и кролика (Wellcome Laboratories, U. K.). Контрольные препараты были получены путем инкубации неиммунной сыворотки морских свинок и кроликов или адсорбированной антисыворотки с веществом Р или лей-энкефалином (100—200 мкг/мл). Первая антисыворотка использовалась в разведениях от 1:100 до 1:400 (объем/объем), а вторая в разведении 1:6 (объем/объем). Препараты ткани исследовали в микроскопе Leitz SM-LUX, снабженном флуоресцентной оптикой.

ХИРУРГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Крыс анестезировали эквитезином и помещали на стереотаксический прибор Дэвида — Копфа. Для повреждения полулунного ганглия в качестве электрода была использована игла из нержавеющей стали, заизолированная до самого кончика. Ток в 3 мА в течение 20 с прикладывался три раза одному и тому же животному в точки с тремя различными координатами по стереотаксическому атласу Пеллегрино и Кушмана [27] ($AP=1{,}7/L=2{,}4/V=-9{,}8$; $AP=-1{,}7/L=3{,}2/V=-9{,}8$; $AP=+0{,}2/L=2{,}9/V=-9{,}8$). За рострокаудальную и латеральную нулевую точку отсчета была принята брегма, а за вертикальную нулевую точку — поверхность твердой оболочки. Повреждение тройничного нерва (ризотомия) в участке изгиба между мостом и его ганглием проводили с помощью крючковатого калиброванного зонда. Зонд вставляли таким образом, чтобы достичь тройничного нерва точно в участке, где нерв оставляет защищающую костную дугу и входит в ганглий. Как только нерв был зацеплен, он пересекался выдвиганием зонда в обратном направлении при одновременном нажатии на основание черепа. Сенсорное тройничное ответвление, которое иннервирует кожу подбородка и слизистую оболочку нижней губы (подбородочный нерв), перерезали с одной стороны на выходе из подбородочного отверстия.

Внутримозговые инъекции проводили через канюлю 30-го калибра, имплантированную в substantia nigra с помощью стереотаксического прибора с координатами по атласу Пеллегрино и Кушмана [27] (AP=—3,0/L=2,0/V=—8). 8 мкг 6-оксидофамина в 2 мкл вводили в течение 4 мин (рис. 6, *д*). Электролитическое повреждение медиального пучка переднего мозга проводили с помощью электрода Копфа из нержавеющей стали диаметром 0,2 мм, заизолированного по всей длине за исключением кончика в 0,5 мм. Пропускали ток 2 мМ в течение 20 с в участок с координатами (AP=—0,6/L=1,7/V=—8,5) (рис. 6, *г*).

Хирургическая деафферентация бледного шара проводилась на стереотаксическом приборе модифицированным ножом Халаса, как описано у Склафани и Гроссмана [28]. Втягивающееся лезвие отпускалось, когда водитель достигал желаемых стереотаксических координат по атласу Кёнига и Клиппеля [21]. После этого водитель перемещался так, чтобы вызвать желаемый тип повреждения. В результате этой процедуры получали крыс с односторонней гемисекцией мозга на уровне середины гипоталамуса (рис. 6, *в*) и с частичным (рис. 6, *б*) и полным (рис. 6, *а*) отделением бледного шара от соседнего комплекса скорлупы и хвостатого ядра.

ИММУНОРЕАКТИВНЫЕ ПО ЭНКЕФАЛИНУ И ВЕЩЕСТВУ Р ВОЛОКНА В ТРОЙНИЧНОЙ СИСТЕМЕ И НИЖНЕМ ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГУ

На нормальных препаратах выявляется концентрирование иммунореактивных по веществу Р(ВР) и энкефалину (Энк) волокон в областях продолговатого мозга, как и было показано ранее [2, 7, 11, 26, 29]. Так, темные полосы ВР-иммунореактивных волокон окружают границы substantia gelatinosa (желатинозное вещество) ядра спинального тракта тройничного нерва. Ретикулярная формация, прилежащая к вентральному расширению ядра спинального тракта тройничного нерва, обнаруживает сетевидную структуру, построенную из ВР-иммунореактивных волокон. Это соответствует области вентрального ретикулярного ядра и вентролатеральному участку гигантоклеточного ретикулярного ядра.

Энк-иммунореактивные волокна наблюдаются в меньшем числе по сравнению с ВР-содержащими волокнами в желатинозном веществе спинального ядра тройничного нерва, в ретикулярной формации и в ядре одиночного пучка. Наоборот, повышенное число Энк-иммунореактивных элементов обнаруживается в периэпендимально-перивентрикулярном сером веществе и в nucleus originis nervi hypoglossus. В этих двух последних структурах энкефалинсодержащие волокна наблюдаются как очень четко очерченные фибриллярные элементы с относительно крупными утолщениями, имеющими вид бусинок. В substantia gelatinosa ядра спинального тракта тройничного нерва Энк-иммунофлуоресценция обнаруживается как в виде точковидных элементов, так и в виде изолированных тел клеток.

Ризотомия тройничного нерва и электролитическое повреждение полулунного ганглия приводят к заметной потере ВР-иммунореактивных волокон в substantia gelatinosa тройничного нерва по сравнению с контралатеральной, неоперированной стороной (рис. 1). Серийные срезы нижнего продолговатого мозга окрашивали попеременно антисыворотками к ВР и лей-энкефалину после электролитического повреждения полулунного ганглия. В образцах, в которых отмечена явная потеря ВР-иммунореактивности, в соседних срезах ядра спинального тракта тройничного нерва не обнаруживается изменений ни в интенсивности, ни в характере распределения Энк-иммунореактивности как на поврежденной, так и на контрольной стороне ядра (рис. 2).

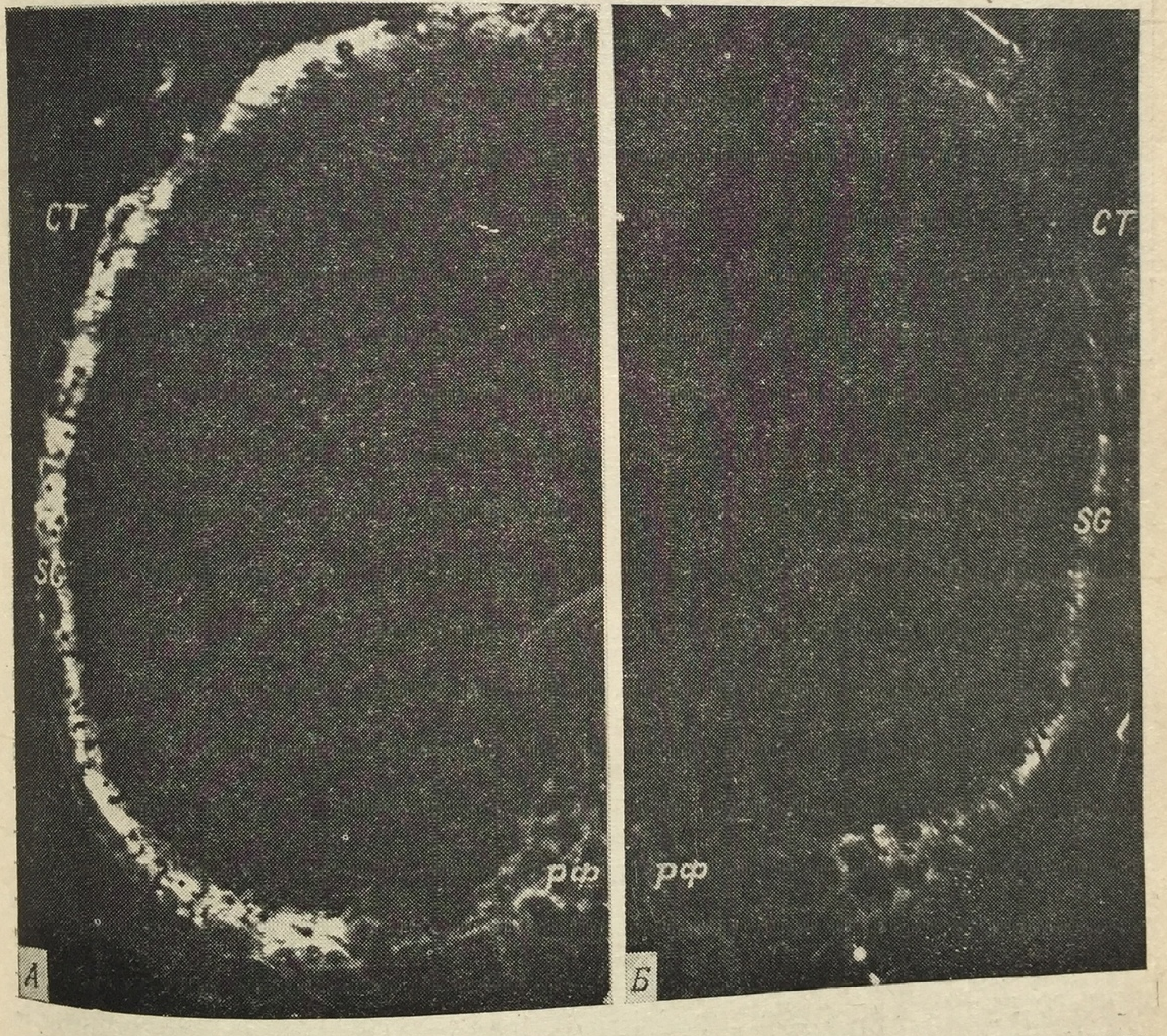


Рис. 1. Иммунофлуоресценция вещества Р в substantia gelatinosa ядра спинального тракта тройничного нерва на неоперированной стороне (*А*) и ипсилатерально по отношению к электролитическому повреждению тройничного нерва (*Б*). СТ — спинальный тракт; SG — substantia gelatinosa; РФ — ретикулярная формация (×66).

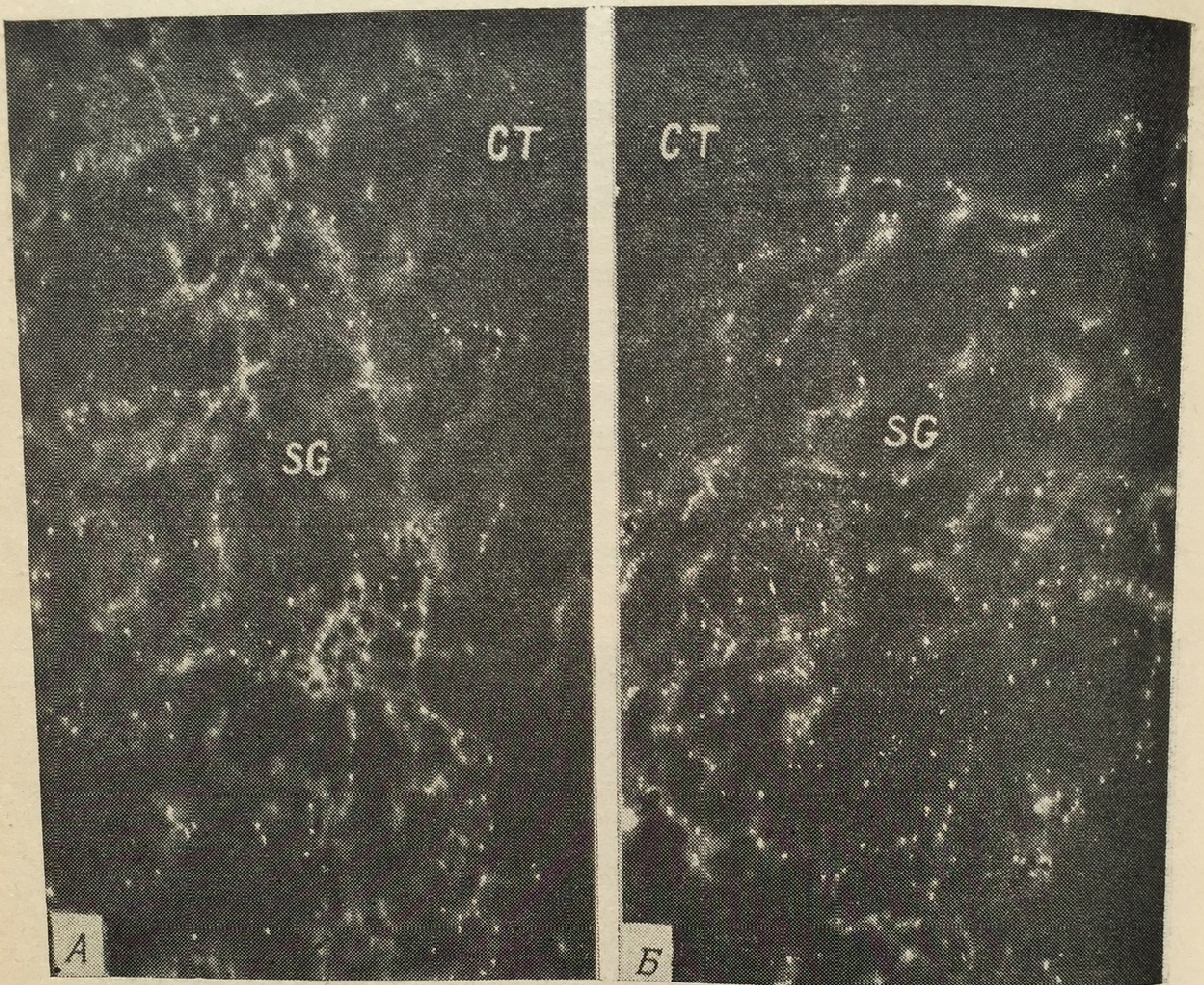


Рис. 2. Сохранение иммунореактивного энкефалина в substantia gelatinosa спинального ядра тройничного нерва после электролитического повреждения гассерова узла. *А*. Неоперированная сторона. *Б*. Оперированная сторона. СТ — спинальный тракт тройничного нерва; SG — substantia gelatinosa спинального ядра тракта тройничного нерва (×212).

ВР-иммунофлуоресценция снижается также и в ретикулярной формации нижней части продолговатого мозга ипсилатерально к повреждению в случае обширного разрушения полулунного ганглия у животных. В других участках нижнего продолговатого мозга не обнаруживается сколько-нибудь значительной потери ВР-иммунофлуоресценции после повреждения полулунного ганглия. Кроме того, не обнаруживается заметной убыли количества Энк-иммунореактивных волокон в ретикулярной формации на окрашенных последовательных срезах (рис. 3). Энк-иммунореактивная сеть в периэпендимально-перивентрикулярном участке ядра одиночного пучка или nuceleus originis hypoglossus остается неизменной у оперированных животных. В связи с этим можно думать, что большинство (если не все) Энк-иммунореактивных волокон имеет центральное происхождение. Такая возможность подтверждается обнаружением Энк-иммунореактивных тел клеток в ядре спинального тракта тройничного нерва и в других областях продолговатого мозга [18, 30].

Тот факт, что Энк-положительные тела нейронов обнаружены в ядре спинального тракта тройничного нерва, показывает, что в этой области мозга энкефалины присутствуют в нейронных цепях. Аналогичные данные были получены ранее Эльде и др. [7, 8] при исследовании substantia gelatinosa заднего рога спинного мозга.

Помимо этого исчезновения ВР-иммунореактивных волокон в спинном мозгу после ризотомии или повреждения полулунного ганглия потеря ВР-иммунофлуоресцентных волокон отмечена в периферических участках тройничного нерва. Более того, сенсорная денервация подбородка и губ вызывает полную потерю ВР-иммунореактивных волокон. В соответствии с этими наблюдениями ВР-содержащие сенсорные нейроны в тройничной системе, а весьма возможно, что и в спинальной, можно представить как нейроны, запасающие ВР как в центральных, так и в периферических терминалях (рис. 4). Значение такого предполагаемого двойственного механизма запасания ВР в обоих типах терминалей одного и того же сенсорного нейрона в настоящее время еще непонятно. Тем не менее полезно вспомнить, что выделение сосудорасширяющих веществ из периферических сенсорных волокон было впервые предложено Дэйлом [4]. Лембек в пятидесятых годах предположил, что этим веществом, обнаруживаемым в сенсорных нервах, может быть вещество Р [25]. Наша анатомическая интерпретация ВР-содержащих сенсорных нейронов может явиться вкладом в понимание антидромного рефлекса и участия вещества Р в периферических сосудистых проявлениях.

Анатомическое распределение центральных окончаний тройничных ВР-содержащих волокон аналогично описанному для ноцицептивных сенсорных нейронов [6, 9]. Идея об участии ВР в восприятии боли подтверждается некоторыми нейрофизиологическими данными, показывающими, что ионофоретическая аппликация ВР в заднем роге спинного мозга усиливает разряды, индуцированные болевой стимуляцией. В противовес этому внутрисосудистое введение морфина оказывает обратное действие на передачу болевого сигнала в спинной мозг [22, 23]. В системе тройничного нерва описанное анатомическое взаимодействие ВР-содержащих волокон сенсорных нейронов ганглионарной природы с Энк-содержащими терминалями центрально расположенных нейронов может иметь некоторое отношение к механизмам восприятия болевых стимулов. В последнее время получены результаты, убедительно подтверждающие такую возможность. Стимуляция высокими концентрациями калия срезов ткани, содержащих ядро спинального тракта тройничного нерва, стимулирует выделение вещества Р, причем это выделение заметно подавляется при суперфузии морфиновыми агонистами или эндогенными пептидами— эффект, который блокируется налоксоном [16]. Эти данные хорошо

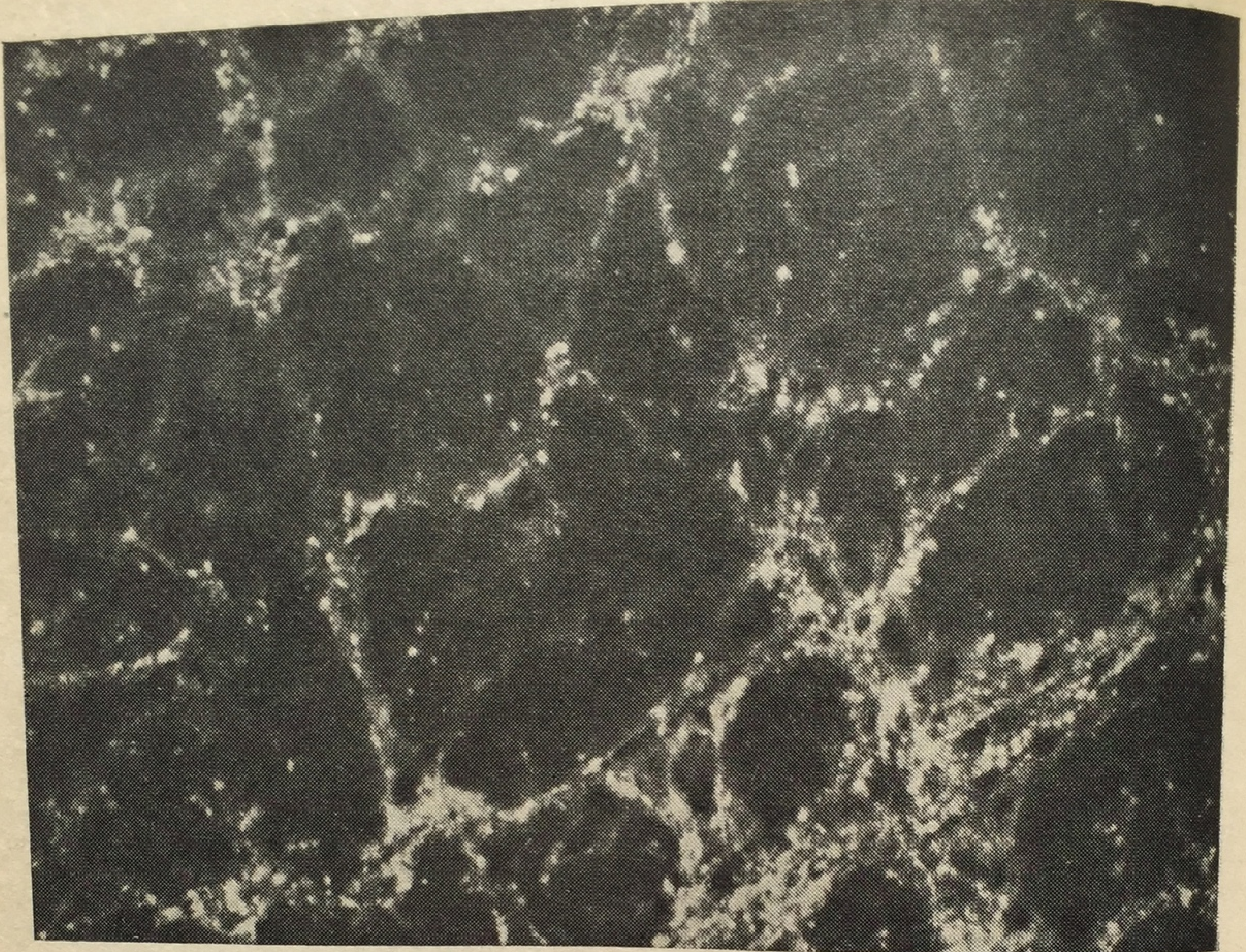


Рис. 3. Иммунофлуоресценция энкефалина в ретикулярной формации нижних волокон продолговатого мозга после одностороннего повреждения полулунного ганглия. (×430).

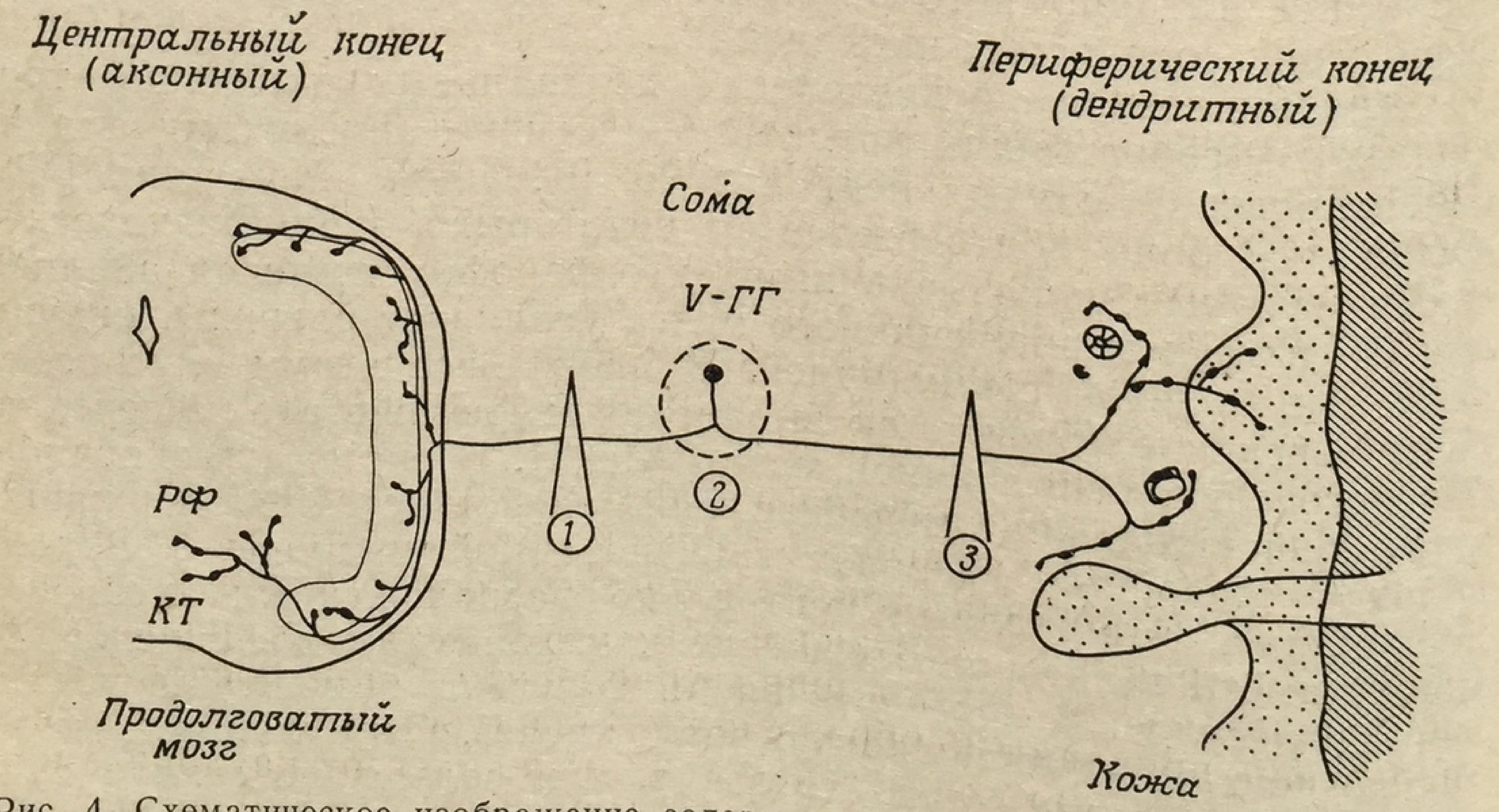

Центральный конец
(аксонный)
Сома
V-ГГ
Периферический конец
(дендритный)
РФ
КТ
1
2
3
Продолговатый
мозг
Кожа

Рис. 4. Схематическое изображение содержащего вещество Р нейрона системы тройничного нерва, вытекающее из результатов наших экспериментов. *1* — ризотомия; *2* — повреждение ганглия (полулунный-гассеров); *3* — сенсорная денервация. РФ — ретикулярная формация; КТ — кортикоспинальный тракт; ГГ — гассеров ганглий.

согласуются с описанным существованием опиатных рецепторов в первичных сенсорных афферентах спинного мозга приматов [24]. Следовательно, можно себе представить, что по крайней мере часть этих пресинаптических рецепторов расположена в центральных окончаниях ВР-содержащих нейронов системы тройничного нерва.

ИММУНОРЕАКТИВНЫЕ ПО ВЕЩЕСТВУ Р И ЭНКЕФАЛИНУ ВОЛОКНА В ЭКСРАПИРАМИДНОЙ СИСТЕМЕ

ВР-иммунофлуоресцентные волокна обнаружены в участках некоторых ядер экстрапирамидной системы. Плотная сеть ВР-иммунореактивных волокон обнаружена в substantia nigra, субталамическом ядре и энтопедункулярном ядре [2, 11, 26]. ВР-положительные тела нейронов обнаружены в комплексе скорлупа — хвостатое ядро и в бледном шаре крыс [2, 19]. Опыты с нанесением повреждений показывают, что эти тела нейронов являются исходными для ВР-содержащих волокон в substantia nigra [15, 17, 19].

Энк-иммунофлуоресцентные волокна также присутствуют в экстрапирамидной системе. Плотная ячееобразная иннервация Энк-иммунореактивных волокон обнаруживается в бледном шаре [7, 29]. Действительно, бледный шар характеризуется наиболее высокой плотностью Энк-иммунофлуоресцентных волокон.

Мы изучали происхождение Энк-иммунореактивных волокон в бледном шаре путем разрушения некоторых восходящих трактов волокон. Так, дофаминэргические проекции substantia nigra в конечный мозг разрушали интранигральным введением 6-оксидофамина (рис. 6,*д*). Это повреждение в параллельных экспериментах вызывало снижение дофамина в стриатуме на 60—70%. Разрушение дофаминэргических и недофаминэргических проекций substantia nigra в системе стриатум — бледный шар было выполнено путем электрокоагуляционного повреждения медиального пучка переднего мозга (рис. 6,*г*) и всех возможных восходящих афферентов бледного шара рассечением мозга с помощью микроножа (рис. 6,*в*). Все эти хирургические процедуры не изменяли интенсивности или особенностей плотной энкефалиноподобной иннервации бледного шара.

Деафферентацию бледного шара от окружающего каудопутамена осуществляли перерезкой ножом на стереотаксическом приборе. Такая перерезка вызывала частичную ростральную деафферентацию (рис. 6,*б*) или более обширную растролатеральную деафферентацию бледного шара (рис. 6,*а*). Этот последний тип перерезки приводил к образованию «полуостровного» бледного шара, который был почти полностью отсоединен от каудопутамена. Косой ростральный разрез вызывал некоторое уменьшение Энк-иммунореактивных волокон в ипсилатеральном бледном шаре. «Полуостровной разрез» (рис. 6,*а*) вызывал более обширную и явную потерю энкефалинергических волокон. Эта потеря волокон

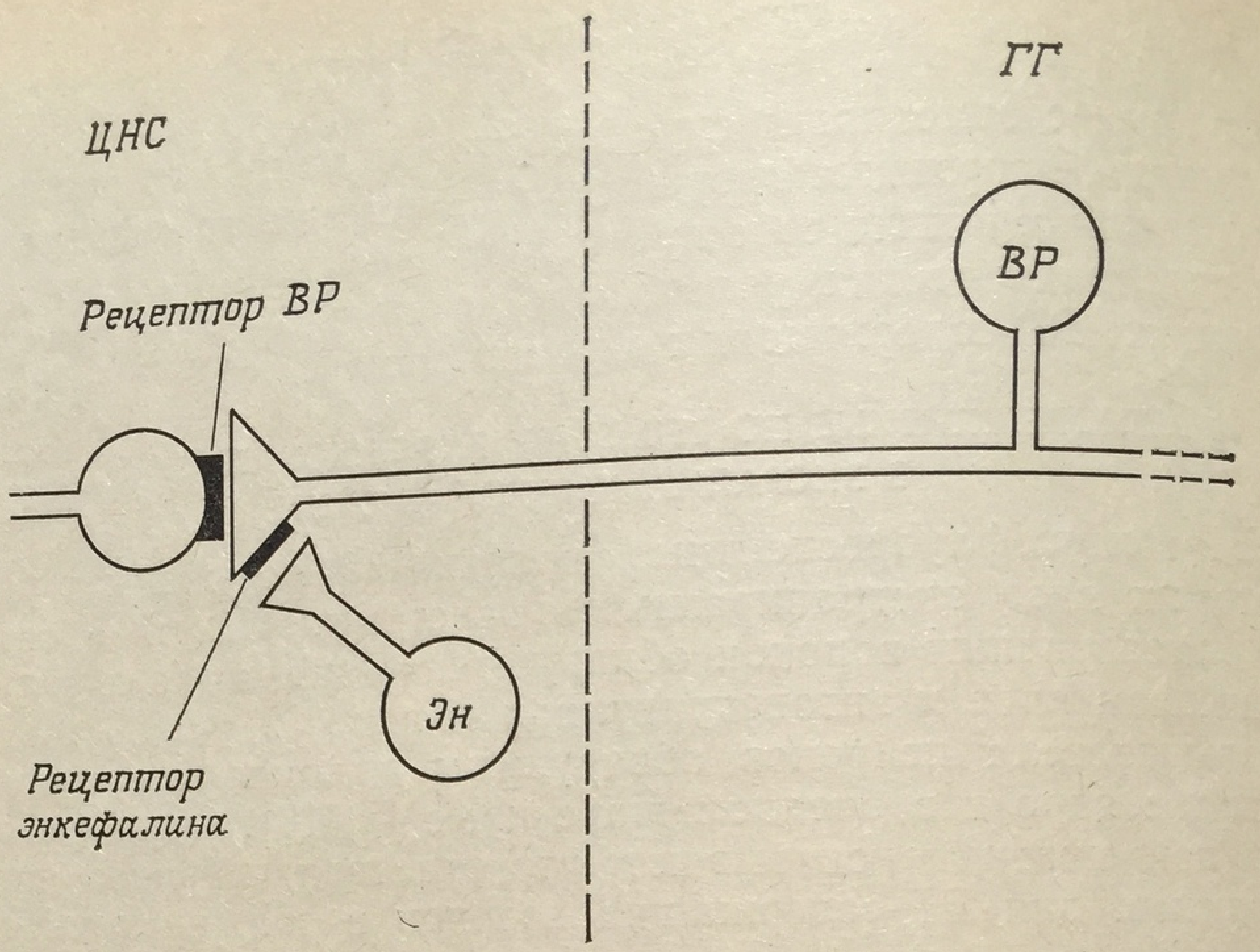


Рис. 5. Схематическое изображение возможной анатомо-функциональной взаимосвязи нейронов системы тройничного нерва, содержащих энкефалин (ЭН) и вещество Р (ВР). Схема построена по данным Ламотт и др. [24], Джесселя и Иверсена [16], Эльде и др. [8], Хёкфельта и др. [12] и результатам настоящего исследования. ГГ — гассеров ганглий.

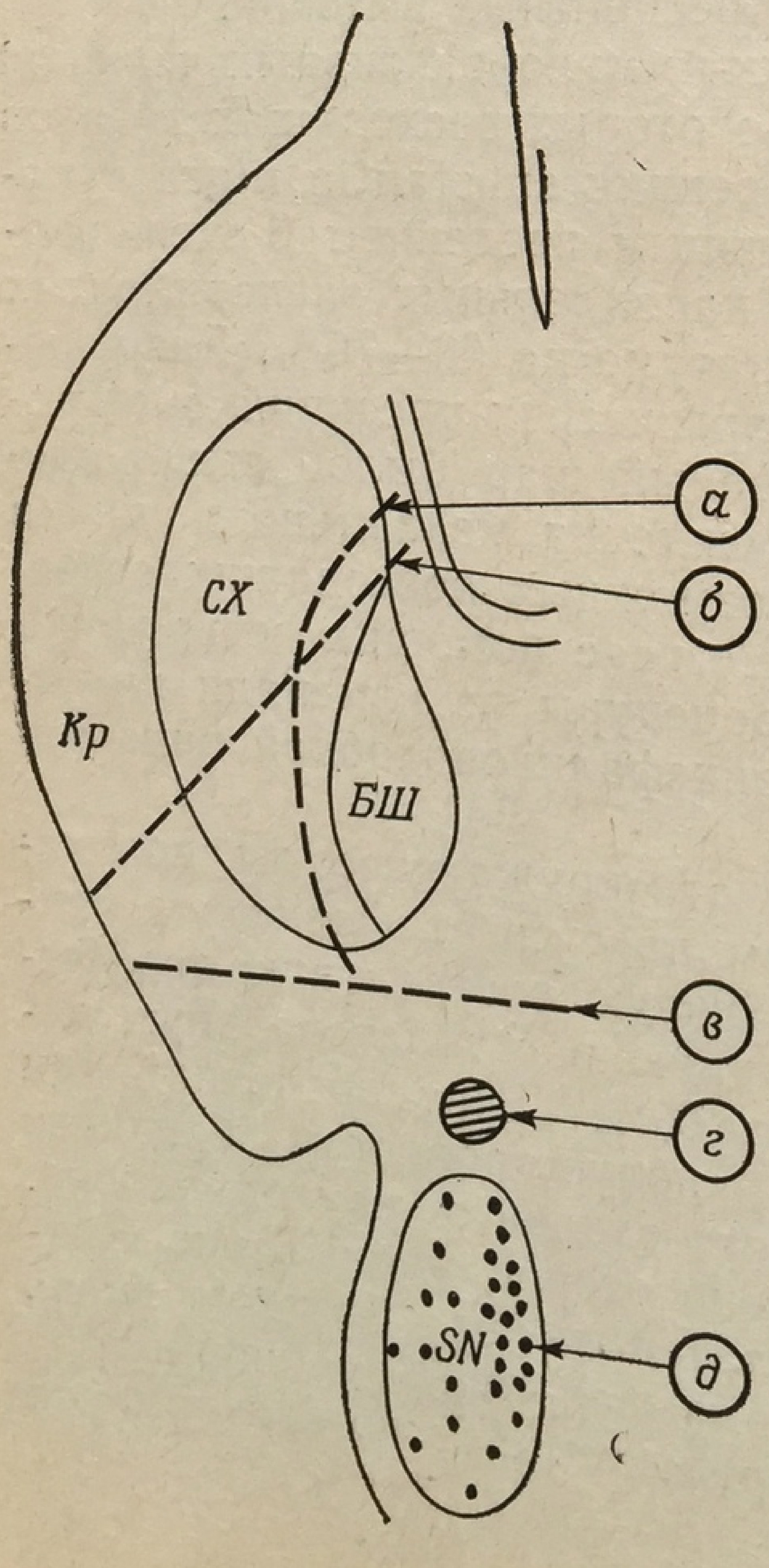


Рис. 6. Схематическое изображение горизонтального сечения мозга крысы. Кр — кора; СХ — скорлупа/хвостатое ядро; БШ — бледный шар; SN — substantia nigra. Указаны различные хирургические процедуры для изучения природы иммунореактивных по энкефалину волокон бледного шара; *а* — полукруговой разрез, отделяющий скорлупу/хвостатое ядро от бледного шара; *б* — косой разрез в скорлупе/хвостатом ядре; *в* — рассечение мозга; *г* — электролитическое повреждение медиального пучка переднего мозга; *д* — инъекция в substantia nigra 6-оксидофамина.

имела отчетливое отношение к степени отсоединения бледного шара от окружающего каудопутамена. Степень потери Энк-иммунореактивных участков после «полуостровной» процедуры можно наблюдать на рис. 7. В ряде случаев наблюдается полосообразное

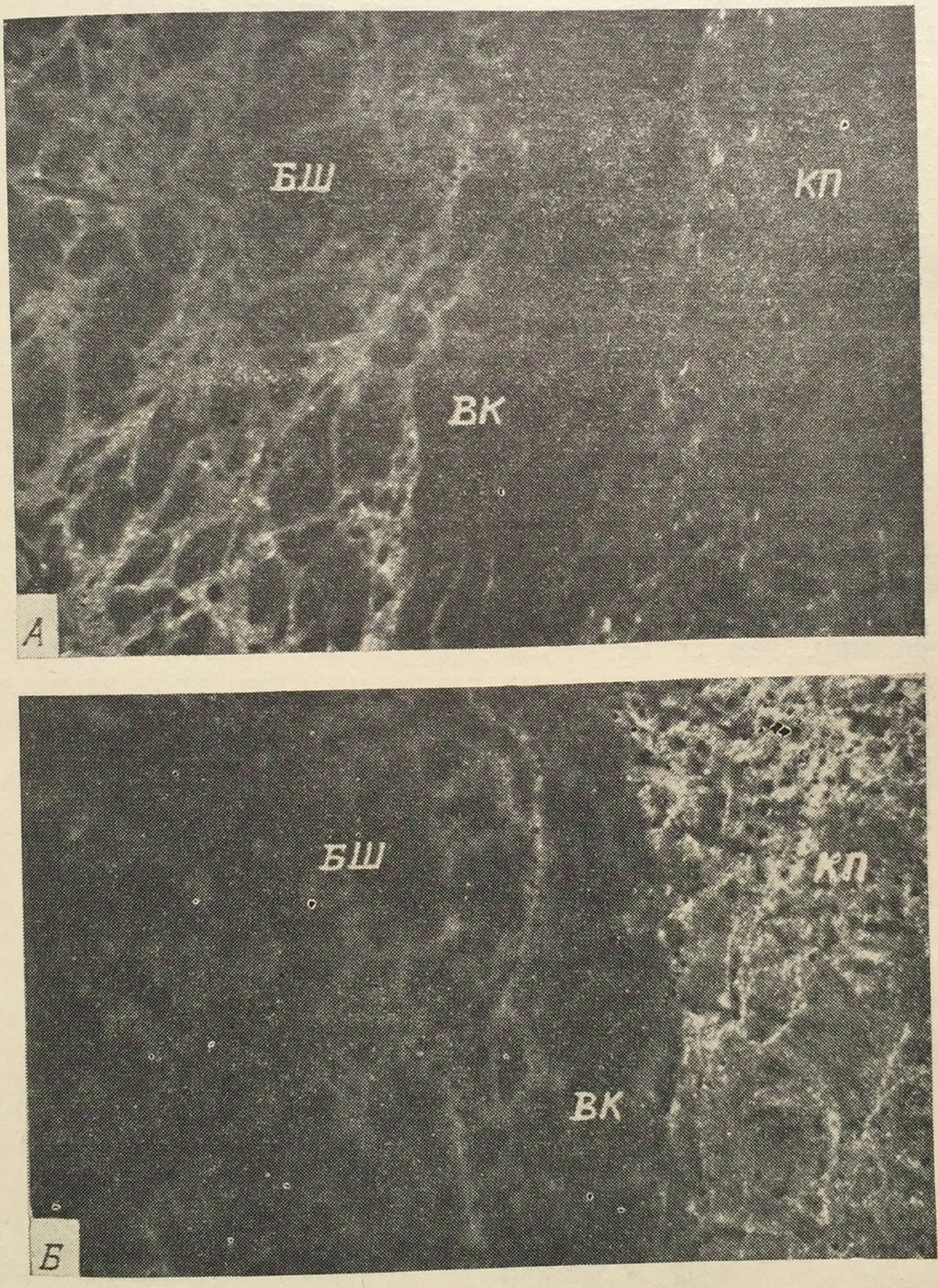


Рис. 7. *А*. Иммунофлуоресценция энкефалина в бледном шаре (БШ) в венечном срезе. Иммунореактивные по энкефалину волокна видны также в интерстициальном ядре концевой полоски (КП). ВК — внутренняя капсула. *Б*. Контрлатеральная сторона после хирургической деафферентации бледного шара. Обратите внимание на потерю иммунофлуоресценции в бледном шаре. (×230).

распределение положительных и отрицательных по Энк-иммунореактивности волокон, что позволяет думать о некоторой топографической организации энкефалинэргического входа в бледный шар. Поскольку бледный шар получает свои главные афференты от каудопутамена [3, 20], можно думать, что эта иннервация представляет собой длинную цепь энкефалинэргических нейронов, начинающихся в каудопутамене и оканчивающихся в бледном шаре. Это предположение подкрепляется выявлением расширенных Энк-иммунофлуоресцентных волокон, распространяющихся в сторону бледного шара на каудопутаментальной стороне разреза, и исчезновением иммунофлуоресценции на стороне разреза, обращенной к бледному шару. Такое «накопление» Энк-иммунореактивного материала на проксимальной стороне повреждения свидетельствует также о существовании механизма транспорта энкефалина в центрально расположенных нейронах. Локализация этого предполагаемого длинного энкефалинэргического тракта показана на рис. 8.

В этих исследованиях с крысами, не получавшими колхицина, мы не обнаружили Энк-иммунореактивных тел нейронов в каудопутамене. Это можно объяснить 1) свойствами сыворотки, 2) отсутствием сохранности запасаемого в соме энкефалина и 3) запасанием энкефалина в телах нейронов в форме «прогормона», не обнаруживающего перекрестной реакции с антисывороткой к энкефалину. Тем не менее Энк-иммунореактивность может быть выявлена в телах нейронов каудопутамена крыс, получавших колхицин [18]. Кроме того, в пользу предположения, что энкефалиновые волокна заключены внутри этого комплекса, говорят следующие данные: как недавно было показано, внутрижелудочковая

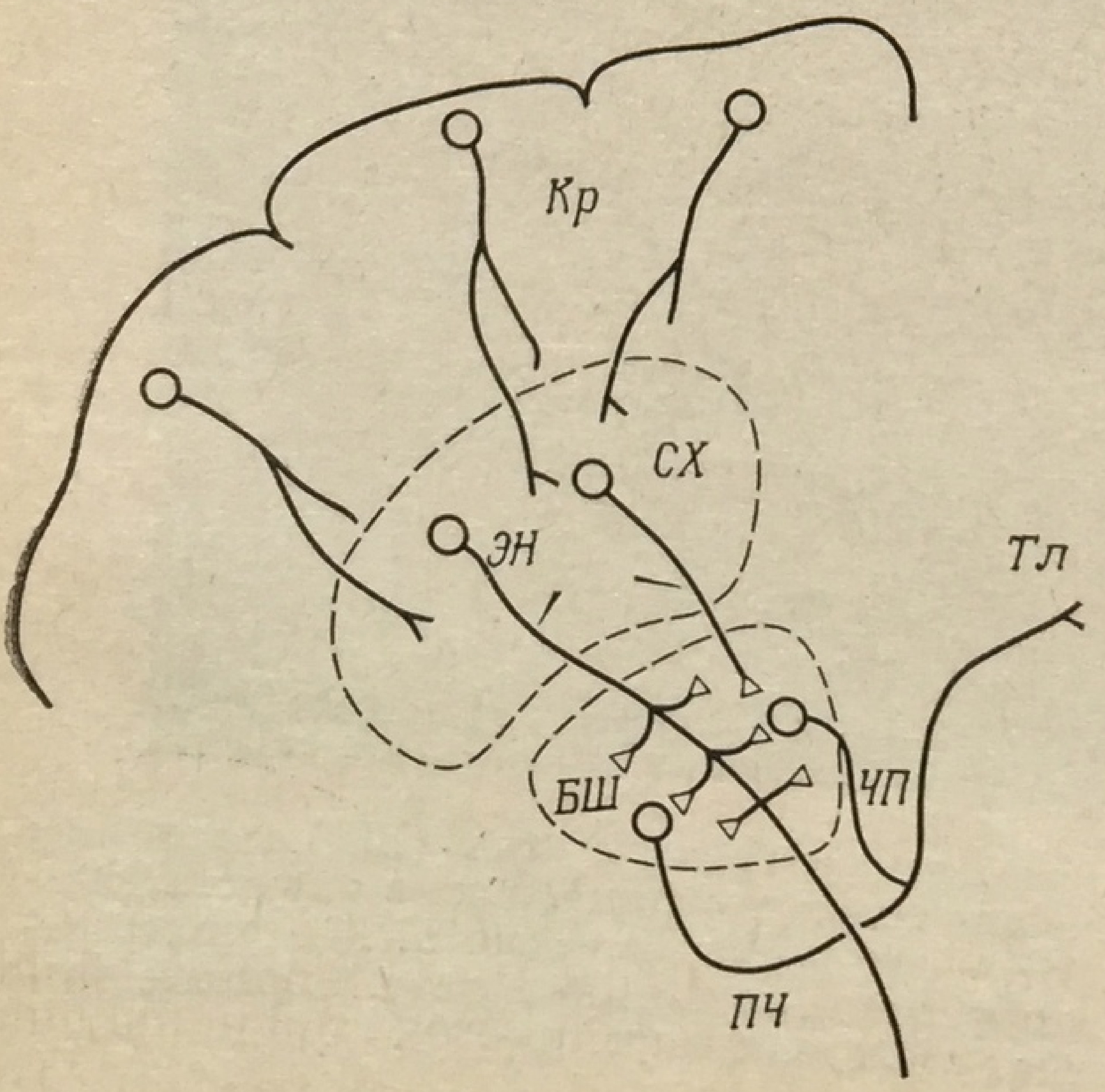


Рис. 8. Схематичеекое изображение некоторых главных афферентных и эфферентных проекций в бледном шаре. Символом ЭН показано расположение предполагаемых длинных энкефалинэргических нейронов, соединяющих скорлупу/хвостатое ядро с бледным шаром. Кр — кора; СХ — скорлупа/хвостатое ядро; БШ — бледный шар; Тл — таламус; ПЧ — петля чечевицеобразная; ЧП — чечевицеобразный пучок.

инъекция каиновой кислоты, приводящая к заметному уменьшению числа клеток в комплексе стриатум — бледный шар, приводит также к 50%-ной потере выявляемого аналитически энкефалина [14]. Возможное кортикальное происхождение этих энкефалинэргических волокон также может быть исключено, поскольку удаление коры не изменяет количества определяемого радиоиммунологически энкефалина в этих ядрах [4, 31]. Наличие длинных энкефалинэргических путей внутри экстрапирамидной системы поднимает много вопросов, касающихся их функциональной роли. Наиболее вероятно, что энкефалины или энкефалиноподобные вещества в этом пути принимают участие в функциях, не связанных с механизмами восприятия боли. Интересно отметить, что в стриато-паллидальной системе отсутствует корреляция между распределением Энк-иммунофлуоресцентных волокон и опиатных рецепторов [29, 30]. Кроме того, можно думать, что взаимодействие опиатных агонистов с рецепторами в скорлупе, бледном шаре и хвостатом теле отличается от такового в стволе мозга и спинном мозгу [5].

⁂

Мы хотели бы выразить благодарность д-ру Л. Л. Иверсену за помощь в исследованиях и за критическое чтение рукописи. Мы благодарим также миссис Л. Мерсер и А. Нельсона за квалифицированную техническую помощь.

Список литературы

1. *Cuello A. C., Polak J. Pearse A. E. G.* Lancet, **2**, 1054—1056 (1976).
2. *Cuello A. C., Kanazawa I.* J. Comp. Neur. (1977). In press.
3. *Carpenter M.* Advances in Neurology, Vol. **14**, 7—18 (1976).
4. *Dale H. H.* Proc. Roy. Soc. Med., **28**, 319—332 (1935).
5. *Della B.* Данное издание (1977).
6. *Denny-Brown D., Yanagisawa N.* Brain, **96**, 783—814 (1973).
7. *Elde R., Hökfelt T., Johansson D., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1977).
8. *Elde R., Hökfelt T., Johnson S. O., Ljungdahl A.. Nilsson G., Jeffcoate S. L.* Biol. Council Symp. In: Centrally Acting Peptides, ed. J. Hughes, Macmillan, London (1977).
9. *Gobel S.* J. Neurocytol., **3**, 219—273 (1977).
10. *Henry J. L.* Brain Res., **114**, 439—451 (1976).
11. *Hökfelt T., Kellerth J. O., Nilsson G., Pernow B.* Science, **190**, 889—890 (1975).
12. *Hökfelt T., Kellerth J. O., Nilsson G., Pernow B.* Brain Res., **100**, 235—252 (1975).
13. *Hökfelt T., Ljungdahl A., Terenius L., Elde R., Nilsson G.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **74**, 3081—3085 (1977).
14. *Hong J. S., Yang H. Y. T., Costa E.* Neuropharmacol., **16**, 451—453 (1977).
15. *Hong J. S., Yang H. Y. T., Racagni G., Costa E.* Brain Res., **122**, 541—544 (1977).
16. *Jessell T., Iversen L. L.* Nature, **268**, 549—551 (1977).

17. *Jessell T., Emson P. C., Paxinos G., Cuello A. C.* Brain Res. (1977), submitted.
18. *Johansson S., Hökfelt T.* Данное издание (1977).
19. *Kanazawa I., Emson P. C., Cuello A. C.* Brain Res., **119**, 447—453 (1977).
20. *Kemp J. M., Powell T. P. S.* Phil. Trans. R. Soc. (London), **262**, 441—457 (1971).
21. *Konig J. F. R., Klippel R. H.* The rat brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem, Williams and Watkins, Baltimore (1963).
22. *LeBars D., Menetrey D., Conseiller C., Besson J. M.* Brain Res., **98**, 261—277 (1975).
23. *LeBars D., Menetrey D., Besson J. M.* Brain Res., **113**, 293—310 (1976).
24. *Lamotte C., Pert C. B., Snyder S. H.* Brain Res., **112**, 407—412 (1976).
25. *Lembeck F., Zetler,* Int. Rev. Neurobiol., **4**, 159—215 (1962).
26. *Nilsson G., Hökfelt T., Pernow B.* Med. Biol., **52**, 424—427 (1974).
27. *Pellegrino L., Cushman A.* A stereotoxic atlas of the rat brain, Appleton Century Crofts, New York (1967).
28. *Sclafani A., Grossman S. P.* Physiology and Behaviour, **4**, 533—538 (1969).
29. *Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder,* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **74**, 2167—2171 (1977).
30. *Uhl G.* Данное издание (1977).
31. *Yang H.-Y. T.* Данное издание (1977).

ЭНДОРФИНЫ, β-ЛПГ И АКТГ: БИОХИМИЧЕСКОЕ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ И АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Х. АКИЛ, С. УОТСОН, Ф. БЕРГЕР, Дж. БАРЧАС

(H. Akil, S. J. Watson, P. A. Berger, J. D. Barchas)

В результате фармакологического изучения эндорфинов было выявлено наличие удивительной параллели между их действием и известными эффектами растительных алкалоидов; это проявлялось, в частности, в развитии анальгезии, толерантности и зависимости [6, 8, 14, 40], в подавлении эффектов антагонистами, такими, как налоксон [6, 8], в способности действовать в качестве положительных подкрепителей [7], в действии на моторную и лимбическую системы. И тем не менее мы остаемся в полном неведении относительно природной, физиологической роли и регуляции этих веществ. Задача выяснения их эндогенной функции оказывается значительно труднее, что объясняется двумя обстоятельствами: отсутствием у нас информации о путях синтеза и деградации этих пептидов, с одной стороны, и природой анатомического распределения энкефалинов — с другой. В настоящее время имеется большое количество данных о том, что энкефалины распространены по всему мозгу в составе многочисленных групп тел нейронов и очень коротких трактов, преимущественно связывающих нейроны внутри данной структуры мозга [16, 38]. Такое распределение, согласующееся с их нейрорегуляторной ролью как межнейронных медиаторов, наводит на мысль о многообразии и разнообразии их функций в различных участках мозга. Функции энкефалинов следовательно, первично определяются связностью внутри любой данной системы, и вряд ли их можно отнести к какой-либо одной большой категории с общим названием — «боль», «двигательная активность» и любая другая поведенческая категория. Это отнюдь не означает, что энкефалины не играют критической роли в такого рода поведении. Это лишь указывает, что следует исследовать многочисленные физиологические и поведенческие модели, чтобы выявить удачную модель для изучения функции и регуляции энкефалинов.

Изложенные ниже данные представляют собой итог попыток, предпринятых нами в течение последних лет для исследования возможной стратегии и моделей в изучении эндорфинов и энкефалинов. Мы остановили свой выбор на сочетании биохимических и анатомических подходов с фармакологически-поведенческими методами для изучения эндогенных опиоидов в лабораторных и клинических условиях.

Методы и основные результаты

ЭКСТРАКЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭНКЕФАЛИНОВ

Мы считали необходимым разработать методические подходы к измерению малых количеств энкефалинов в головном мозгу и спинномозговой жидкости (СМЖ). В основе этих подходов лежали два главных соображения: необходимость избежать деградации эндорфинов и энкефалинов в ходе экстрагирования и сочетание процедуры экстракции с радиорецепторным и радиоиммунологическим испытаниями, позволяющее избежать неспецифического ингибирования. В результате мы пришли к выводу, что наиболее эффективна следующая методика:

1. Ткань мозга или участков мозга гомогенизировали в охлажденной в ледяной бане 0,4 н. хлорной кислоте. СМЖ подкисляли хлорной кислотой до конечной концентрации 0,4 н. Ткань затем центрифугировали при 35 000 g. Надосадочную фракцию собирали и доводили pH до 7,4, используя KOH. Белый преципитат осаждали при 35 000 g и надосадочную жидкость использовали для следующего этапа. При использовании специфического радиоиммунологического теста энкефалины можно было определять непосредственно в этой надосадочной фракции. Последующие два этапа были предназначены для отделения энкефалинов от более крупных эндорфинов, удаления различных ионов и молекул, искажающих результаты определения связывания, и для концентрирования материала, особенно полученного из СМЖ.
2. Материал наносили на колонку с Biobeads или XAD-1 (0,6×8 см), колонку промывали 20 мл воды и материал элюировали в 3 мл абсолютного метанола и выпаривали под вакуумом [32]. Поскольку элюат мог использоваться в тестах на связывание, возникали проблемы «нулевой точки» при сильном концентрировании малых количеств энкефалинов.
3. Элюат с XAD-1 ресуспендировали после выпаривания в аммонийно-ацетатном буфере (0,1 *M*, pH 7,4) и наносили на анионообменную колонку (AG1-X2, 0,6×4 см). Хлорнокислый экстракт, полученный в конце этапа 1, можно было наносить непосредственно на эту колонку, минуя этап 2. Колонку промывали 5 мл 0,1 *M* ацетатно-аммонийного буфера и материал элюировали 2 мл 0,2 *M* уксусной кислоты. Элюат выпаривали, суспендировали в подходящем буфере и добавляли в тест-систему.

РАДИОРЕЦЕПТОРНОЕ И РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ

Радиорецепторное тестирование. Мы модифицировали радиорецепторный тест, использовав ^{3}H-мет-энкефалин в качестве меченого связывающегося агента. Неочищенный гомогенат мозга (50 мМ трис) промывали три раза, и ресуспендированный осадок предварительно инкубировали при 25°C в течение 1—2 ч перед окончательным центрифугированием. Отношение общего связывания к неспецифическому было равно 3 : 1, а чувствительность теста составляла примерно 0,25 пмоль энкефалина.

Радиоиммунологический тест на мет- и лей-энкефалины. Для получения антисыворотки к мет-энкефалину использовали подлинный мет-энкефалин, связанный с бычьим сывороточным альбумином методом глутаральдегидного сочетания [33]. Самок новозеландских кроликов иммунизировали многократными (с месячными интервалами) инъекциями в участки спины и обескровливали спустя две недели после реиммунизации. При разведении $^1/_{250}$ ^{3}H-мет-энкефалин в концентрации 1,5 нМ вызывал 30%-ное связывание. Чувствительность этого теста составляла 1—2 нМ при эффективном диапазоне от 2 до 500 нМ. Следующие пептиды и опиаты не обнаруживали перекрестной реактивности при концентрации 1 мкМ (и были, следовательно, по крайней мере в 500 раз менее эффективны, чем мет-энкефалин): глицин, Gly-Gly-Phe, Gly-Phe, Gly-Gly, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Phe-Leu, тирозин, метионин, β-эндорфин, β-липотропин (любезно предоставленный доктором Ли), Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (лей-энкефалин), налоксон, налтрексон, леворфанол и морфин. По способности вытеснять связанный с антителами ^{3}H-мет-энкефалин пептид β-эндорфин оказался в 370 раз менее эффективным, чем мет-энкефалин.

Антисыворотка к лей-энкефалину была получена таким же образом. Сыворотка была использована при разведении $^1/_{200}$ с эффективным диапазоном для связывания ^{3}H-лей-энкефалина от 2 нМ до 400 нМ. Эти антитела не обнаруживали перекрестной реактивности с различными пептидными фрагментами энкефалинов и опиатными алкалоидами при их концентрации 1 мкМ. В вытеснении связанного ^{3}H-лей-энкефалина мет-энкефалин был примерно в 20 раз менее эффективен, чем лей-энкефалин. Типичные значения для содержания мет-энкефалина в цельном мозгу, полученные при использовании описанных выше методик, были близки к 400 пмоль/г; отношение мет-энкефалина к лей-энкефалину было близко к 9 : 1. В СМЖ человека нормальное значение для общей энкефалиноподобной активности составляло 3,4±1,1 пмоль/мл.

β-ЛИПОТРОПИН В МОЗГУ. ЭКСТРАГИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ

Предположение, что β-липотропин (β-ЛПГ) может служить предшественником β-эндорфина и мет-энкефалина, побудило нас исследовать его наличие в мозгу крыс. Мы использовали специфические антитела к β-ЛПГ, любезно предоставленные нам доктором Ли и описанные в работе Рао и Ли [29]. Эти антитела первично реактивны к N-концевому участку β-ЛПГ и не обнаруживают перекрестной реактивности с β-меланоцитстимулирующим гормоном, с β-эндорфином человека, с мет-энкефалином, с лей-энкефалином, АКТГ, окситоцином, вазопрессином и различными пептидными фрагментами мет-энкефалина.

Мы использовали модификацию экстракции смесью HCl-ацетон, как описано у Ли и др. [21]. Мы применяли также осаждение 0,4 н. хлорной кислотой, чтобы определять содержание β-ЛПГ и энкефалина в одной и той же ткани. В обоих случаях выход составлял около 75%.

Использовав этот подход, мы обнаружили β-ЛПГ-подобную иммунореактивность в мозгу крыс. Кривая замещения характеризуется наклоном, несколько отличающимся от такового для β-ЛПГ человека, что, по-видимому, объясняется различным сродством этих соединений к антителам. Это может быть обусловлено многими причинами, в том числе некоторыми различиями в структуре между человеческим и крысиным β-ЛПГ. В табл. 1 суммированы результаты проведенного нами предварительного определения β-ЛПГ-подобной реактивности в различных участках мозга крыс, основанные на двух методах экстракции ($n=4$ на участок).

Таблица 1

Содержание иммунореактивного β-ЛПГ в мозгу крыс[1]

Участок мозга	Содержание, пмоль/г ткани
Гипофиз	50 000
Гипоталамус	700
Средний мозг с лимбическими структурами	125
Мозжечок	25
Цельный мозг (без мозжечка)	75

[1] Распределение β-ЛПГ между клетками мозга описано ниже.

Иммуноцитохимическое изучение

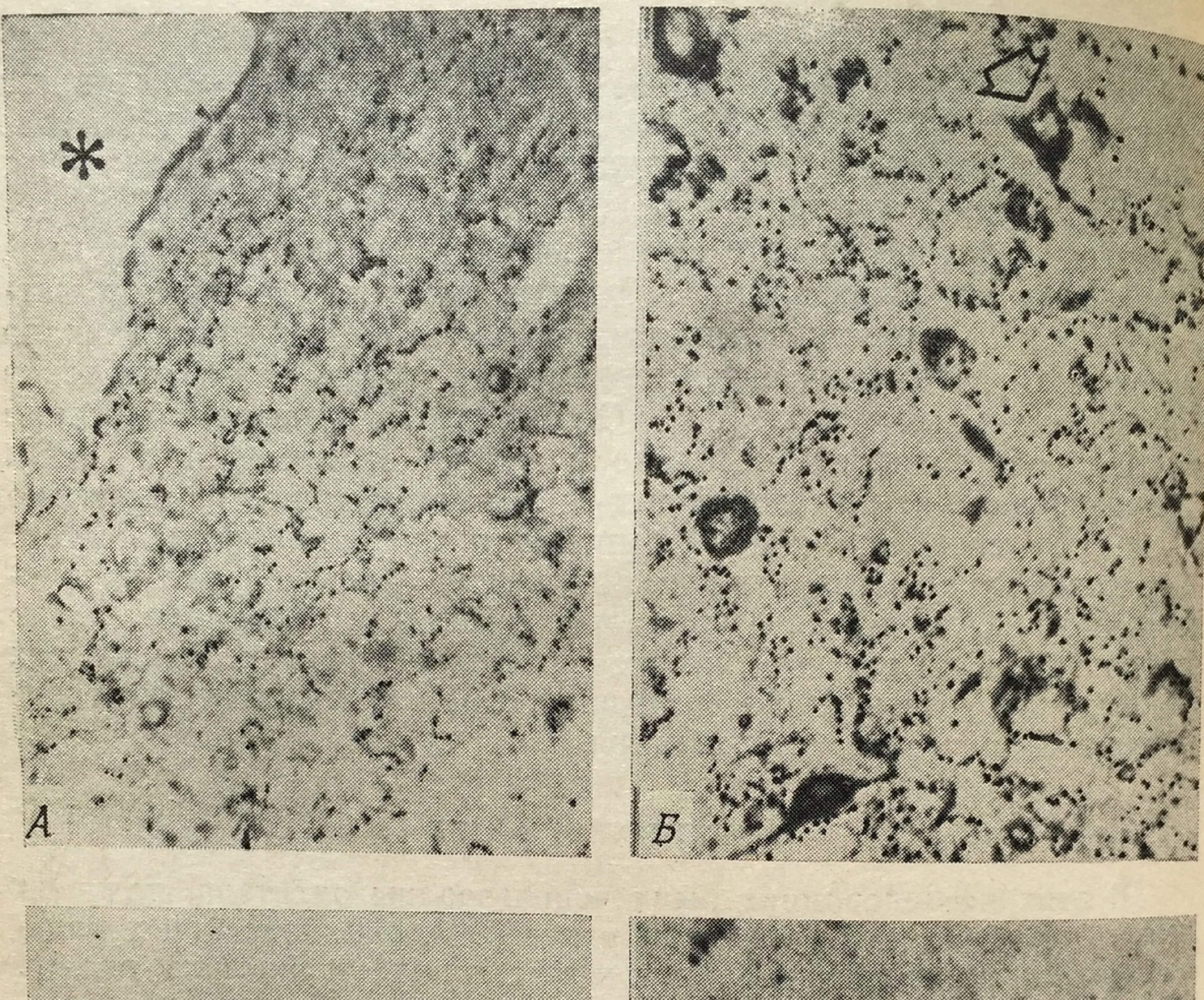
ЭНКЕФАЛИНЫ

Специфические антитела, полученные против мет- и лей-энкефалинов, были использованы для обширного картирования энкефалинов в мозгу. Специфичность антисыворотки позволила использовать антитела к мет-энкефалину в присутствии избытка лей-энкефалина (10 мкМ). И наоборот, антисыворотка к лей-энкефалину использовалась в присутствии избытка мет-энкефалина (10 мкМ). Обе антисыворотки выявляли аксоны, терминали и тела нейронов без какой-либо предварительной обработки колхицином. Соответствующую активность можно было легко блокировать добавлением к антисыворотке специфического антигена — например, добавлением мет-энкефалина (10 мкМ) к антителам против мет-энкефалина. Указанная активность, таким образом, впервые дала возможность специфически продемонстрировать распределение мет-энкефалина в мозгу [38]. Общее анатомическое описание энкефалинов приведено детально в других статьях [11, 31, 38]. При сравнении распределений мет- и лей-энкефалинов не выявлено каких-либо специфических различий в анатомии двух систем. К настоящему времени, однако, еще неясно, имеют ли эти предполагаемые нейромедиаторы уникально идентичное распределение в раздельных системах, или же они существуют внутри одних и тех же нейронов. Для решения этой проблемы нами начаты электронно-микроскопические исследования.

β-ЛИПОТРОПИН И АКТГ

В этих исследованиях были использованы антитела, полученные от доктора Ли и описанные ранее [39]. β-Липотропин хорошо выявляется в цитоплазме клеток и в четковидных аксонах (рис. 1). Наиболее высокое содержание β-липотропина обнаружено в медиальном гипоталамусе (с телами нейронов в медиальном базальном гипоталамусе и аркуатном участке), в перивентрикулярном ядре таламуса в области чечевицеобразной петли, в zona compacta substantia nigra (черного вещества), в медиальном миндалевидном ядре, в zona incerta периакведуктальной центральной серой области, в locus coeuleus и в малочисленных волокнах ретикулярной формации.

Установленное этим методом распределение β-ЛПГ соответствует результатам радиоиммунологического теста, показывающего, что наиболее высокая концентрация β-ЛПГ находится в гипоталамусе. Это распределение, однако, отличается от распределения энкефалинов, описанного иммуноцитохимически. Хотя имеется несколько областей, в которых между содержанием энкефалинов и β-ЛПГ наблюдается соответствие (например, высокие концентрации в центральном сером веществе и медиальном таламусе, отсутствие активности в мозжечке), имеется также и несколько областей, в которых нет такого соответствия (например, высокие концентрации энкефалинов в бледном шаре и центральном миндалевидном ядре при низкой активности β-ЛПГ в этих участках). Распределение β-ЛПГ-реактивных тел нейронов в периаркуатном участке строго характерно для этого вещества и отличается от характера распределения энкефалин-положительных клеток в дор-


*
А
Б
В
Г

сальном гипоталамусе. В настоящее время предпринимаются попытки нанести специфические повреждения с одновременной визуализацией и определением содержания β-ЛПГ и мет-энкефалина, с тем чтобы определить параллелизм и различия этих двух систем.

Возможно, что описанное в этой статье распределение β-ЛПГ может соответствовать распределению β-эндорфина, а не мет-энкефалина. Если это так, то система β-ЛПГ — β-эндорфин должна, казалось бы, быть анатомически разобщена с мет-энкефалином. Предварительные исследования повреждений показали, что система β-ЛПГ исходит из клеток медиальнобазального гипоталамуса и проецируется вдоль всего спинного мозга.

Пеллетье и др. [28] показали, что АКТГ (адренокортикотропный гормон) и β-ЛПГ обнаруживаются в одних и тех же запасающих гранулах кортикотрофов и клеток интермедиальной доли гипофиза. Недавно Мэйнс и др. [24], используя линию клеток мышиной опухоли гипофиза A+T—20/D—16v, показали, что АКТГ и β-ЛПГ имеют общий белковый предшественник и что АКТГ, β-ЛПГ и β-эндорфин запасаются и затем выделяются совместно. Кригер и др. [20], используя радиоиммунологический тест, обнаружили присутствие АКТГ в некоторых областях мозга крыс. Принимая во внимание эти результаты и описанную в данной статье локализацию β-липотропина, мы предприняли иммуноцитохимическое изучение АКТГ в мозгу крыс. Используя очищенные аффинной хроматографией антитела в АКТГ$_{11-24}$ [10] (любезно предоставленные Р. Мэйнсом и Б. Эйпером), мы получили возможность локализовать АКТГ-положительные клетки и волокна в некоторых участках мозга крыс. Клетки, дающие при окрашивании положительную реакцию на АКТГ, обнаруживаются в аркуатном ядре и несколько латеральнее его. Плотные волокна видны в срединном возвышении аркуатного участка и в ближайшем окружении третьего желудочка. Остальная часть гипоталамуса, перивентрикулярный таламус, периакведуктальная серая область, медиальное миндалевидное ядро содержали умеренное количество АКТГ-положительных волокон. Антисыворотка к АКТГ не блокировалась β-липотропином и β-эндорфином, но полностью блокировалась 100 нМ АКТГ$_{1-24}$. В предварительных исследованиях односторонние повреждения, вызывающие снижение количества или разрушение

Рис. 1. *А*. Четковидные β-липотропинсодержащие волокна в вентромедиальном ядре гипоталамуса вблизи III желудочка (звездочка) взрослых крыс (×207). Непрямой иммуногистохимический метод с использованием в качестве маркера пероксидазы хрена и диаминобензидина. *Б*. Содержащие β-липотропин тела́ и отростки нейронов в аркуатном ядре того же животного, что и на рис. *А* (×414). Метод окраски тот же, что и на рис. *А*. Обратите внимание на обозначенное стрелкой слабо окрашенное клеточное ядро. *В*. АКТГ-содержащие волокна в вентромедиальном ядре гипоталамуса (×414). *Г*. *АКТГ*-содержащие клетки в аркуатном ядре того же животного, что и на рис. *В* (×414). Обратите внимание на слабо окрашенные клеточные ядра.

β-ЛПГ-содержащих волокон, снижали также и количество АКТГ-содержащих волокон на пораженной стороне. У гипофизэктомированных крыс на 12-й день после операции не отмечалось изменений активности АКТГ в мозгу.

Хотя эти результаты еще и не доказывают сосуществования АКТГ, β-ЛПГ и β-эндофина в одних и тех же клектах, они соответствуют тезису об общем предшественнике. Интересно подумать над следующим предположением: если АКТГ и β-эндорфин активны в мозгу и обнаруживаются в одних и тех же нейронах, то их регуляция по принципу обратной связи, взаимодействие с рецепторами и фармакология должны быть относительно сложными процессами. Возможное выделение двух активных нейрорегуляторных пептидов единичной клеткой может существенно повлиять на сформулированный Дэйлем принцип «одна клетка — один медиатор». И наконец, если будет доказано участие опиоидных пептидов в возникновении психозов или в контроле настроения, то связь между этими психологическими состояниями и стрессом может оказаться более прямой, чем это ранее предполагалось.

Стресс и эндогенные опиоиды

Недавно мы описали феномен индуцированной стрессом анальгезии [2, 23]. Наблюдаемое при этом поведение включает в себя резкое увеличение латентности подергивания хвостом после перемежающегося неизбегаемого шока конечностей. При повторении сеансов стресса феномен постепенно затухает вплоть до полного отсутствия постстрессовой анальгезии. Мы описали также значительные изменения опиатоподобной активности в мозгу, причем ее увеличение коррелировало с анальгезивным эффектом [2, 23]. Следует отметить, однако, что при этих измерениях не производилось разграничения энкефалинов и эндорфинов или возможных активных предшественников. И хотя в наших опытах общая опиатоподобная активность, казалось бы, изменялась, другие исследователи, использующие радиоиммунологический тест, не обнаруживали специфических изменений в содержании энкефалинов [13]. В связи с этим предпринимаются попытки исследовать специфические изменения в содержании β-эндорфина и энкефалинов в различных участках мозга после такого стресса. Тем временем проводятся и некоторые фармакологические исследования для дальнейшего изучения этого феномена.

ОБРАТИМОСТЬ АНАЛЬГЕЗИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ НАЛОКСОНА

Индуцированная стрессом анальгезия может быть частично блокирована предварительным воздействием налоксоном в дозе 10 мг/кг [2]. В двух независимых исследованиях обнаруживалось достоверное влияние обработки налоксоном до стресса на постстрессовую чувствительность к боли (через 3 мин после стресса латентность в контроле составляла 5,2 с, у животных, получавших налоксон, — 3,6 с; $p < 0{,}02$). Необходимо, однако, отметить, что эта блокада является неполной и что у различных животных налоксон действует по-разному. Хотя эффект налоксона свидетельствует о важной роли эндогенных опиоидов в индуцированной стрессом анальгезии, его частичный и изменчивый характер указывает также на то, что данный феномен представляет собой очень сложное явление, включающее как опиоидные, так и не опиоидные механизмы подавления боли.

ВЛИЯНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ОПИАТАМ

Мы предположили, что толерантность к морфину может приводить к феномену, подобному «перекрестной толерантности» к стрессу, иначе говоря, у толерантных к морфину животных действие стресса на чувствительность к боли должно быть ослабленным. В двух отдельных экспериментах мы имплантировали крысам пилюли морфина ($n=6$) в течение 3 последовательных дней. Крысы контрольной группы получали пилюли плацебо. Через 36 ч после последней имплантации пилюль у животных проверяли реакцию подергивания хвостом; экспериментальные животные действительно оказывались толерантными к морфину, поскольку их базальная реактивность была такой же, как и у контрольных животных (в обеих группах реакция наступала через 3,9 с). Крыс обеих групп позже подвергали стрессу, исходя из обычных параметров шока конечностей (3 мА, продолжительность 1 с, 1 импульс в 5 с). В контрольной группе животных наблюдали обычную картину анальгезии с возвращением к контрольной латентности через 15 мин после стресса. Парадоксально, что в группе толерантных к морфину животных действие стресса было усилено. У них развивается полная анальгезия, причем состояние анальгезии сохраняется в течение нескольких часов и не возвращается к исходному уровню (для сравнения см. табл. 2). Создается впечатление, что стресс подавляет толерантность к морфину, а не индуцирует перекрестную толерантность. Возможные механизмы, обусловливающие феномен, в настоящее время исследуются.

В заключение можно сказать, что приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что между эндогенными опиоидами, стрессом, болью и толерантностью к опиатам существует, по-видимому, сложное взаимодействие. Оказалось, что индуцированная стрессом анальгезия частично блокируется налоксоном и в проверочных опытах снижается при инфузии антител к мет-энкефалину. С другой стороны, толерантность к морфину не только неэффективна в блокировании индуцированной стрессом анальгезии, но и приводит к парадоксальному усилению анальгезивного ответа.

Таблица 2

Влияние хронического введения морфина на индуцированную стрессом анальгезию. Латентность подергивания хвостом (в секундах). Отключение = 8 см

	Базальный уровень	После стресса				
		опыт				
		1—3	4—6	7—9	10—12	13—15
Контрольная группа ($n=6$) x±СО 1)	3,9 ± 0,1	7,7 ± 0,2	6,1 ± 0,6	4,6 ± 0,5	4,0 ± 0,5	3,5 ± 0,3
Группа с таблетками морфина ($n=6$) x±СО 1)	3,9 ± 0,2	7,95 ± 0,1	7,9 2) ± 0,1	7,9 3) ± 0,1	7,5 3) ± 0,3	7,6 3) ± 0,2

1) СО — средняя ошибка. Отличие от контроля по t-тесту.
2) $p<0{,}02$.
3) $p<0{,}001$.

Анальгезия, вызываемая стимуляцией

Анальгезия, возникающая в результате электрической стимуляции перивентрикулярного и периакведуктального участков, была описана у крыс, кошек и человека [4, 22, 26, 30]. Эта анальгезия является избирательной и может обнаруживать толерантность и перекрестную толерантность к опиатам. Феномен частично блокируется антагонистом опиатов налоксоном у всех трех видов [3, 17, 27, 30], хотя эффект оказывается вариабельным и плохо воспроизводимым из-за использования разных животных и неодинаковых экспериментальных условий [3, 41]. И все же эти результаты показывают, что электрическая стимуляция этой медиальной системы может функционировать частично путем высвобождения эндогенных опиатов и активации системы, модулирующей боль. Дальнейшим косвенным подтверждением этой гипотезы служат анатомические данные, показывающие, что центральное серое вещество и перивентрикулярное ядро оказываются одними из участков, наиболее богатых эндогенными опиоидами, включая энкефалины [38] и предполагаемый прогормон β-ЛПГ [39]. Мы попытались проверить правомочность гипотезы стимуляционно-анальгезивной активации эндогенных опиоидов в исследованиях на животных и человеке.

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ

В проверочных опытах мы имплантировали крысам биполярные электроды в участок мезэнцефалического центрального серого вещества (с помощью стандартной процедуры на стереотаксическом приборе). После заживления наносимых при этом повреждений у крыс проводили тест на анальгезию, используя в качестве критерия признак подергивания хвоста. Для биохимической стадии эксперимента брали только тех животных, у которых после стимуляции достоверно увеличивалась латентность. Идеальные параметры для индукции анальгезии определялись индивидуально для каждого животного. В этих экспериментах были использованы три группы: контрольная группа животных, в которой проводили имплантацию электродов и тестирование без стимуляции перед забоем животных; группа, в которой у животных производили раздражение центрального серого вещества за 20 мин до забоя; группа, в которой электростимуляция проводилась в течение 3 ч до забоя. Мозг крыс быстро извлекали и из него отделяли центральный участок (продолговатый мозг — мост), срединный участок (включая участок среднего мозга, в который имплантировали электроды) и ростральный участок, включающий стриатум (полосатое тело). Выделенные участки экстрагировали, используя описанную выше хроматографию на XAD-1, и определяли содержание энкефалиноподобной активности с использованием радиорецепторного теста. Как показали полученные нами результаты, длительная электрическая стимуляция участков мозга приводила к достоверному снижению содержания эндогенных опиоидов (70±8% от контрольного уровня, $p<0{,}05$), за которым следовало компенсаторное увеличение через 3 ч после стимуляции (150±10% от контрольного уровня, $p<0{,}02$).

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЧЕЛОВЕКЕ

Примерно 30 больных с неподдающимися лечению болями получали интрацеребрально стимуляторы для облегчения боли [30]. В течение первой стадии хирургического вмешательства при стереотаксическом введении электродов под местной анестезией было возможно получать много образцов СМЖ. Мы получали такие серии образцов от 8 пациентов, причем первый образец в каждой серии всегда отражал предшествующий стимуляции базальной уровень, а последующие 3—4 образца отбирались примерно с 5-минутным интервалом в течение анальгезирующей электрической стимуляции. Полученные образцы мы исследовали либо в сотрудничестве с доктором Дж. Хьюсом (Эбердин, Шотландия) с использованием теста на vas deferens, либо самостоятельно с помощью описанного выше анионообменного метода. И хотя у некоторых больных и отмечалось временное снижение содержания энкефалинов в течение нескольких минут после начала стимуляции, у всех исследованных нами пациентов содержание энкефалиноподобного материала повышалось между 20 и 30 минутами. (Наша процедура: базальный уровень — 0,68±0,2 пмоль/мл; через 25 мин стимуляции — 0,88±0,3 пмоль/мл; критическое значение по парному t-тесту=2,93; $p<0{,}02$). Не следует беспокоиться, что базальный уровень у этих больных оказывается значительно ниже приведенного выше нормативного уровня (3,1 пмоль/мл); этот результат подтверждает данные Террениуса и Вальстрома [35] о снижении содержания эндогенных опиатов в люмбальной СМЖ у пациентов с болями.

В приведенных исследованиях впервые было продемонстрировано высвобождение эндогенных опиоидов in vivo у человека. В сочетании с данными, полученными при изучении животных, эти результаты дают основание думать, что при фокальной стимуляции определенных участков мозга содержание энкефалинов может существенно изменяться. Более специфические повреждения могут, вероятно, позволить получить более точную оценку динамики изменений, происходящих после электрической стимуляции.

Клинические исследования

Некоторые авторы предполагают, что эндогенные опиоиды играют важную роль в развитии психических расстройств у человека [1, 5]. В предварительном сообщении Терениус и др. [36] указывали на повышение содержания эндогенных опиоидов в СМЖ больных шизофренией — эффект, который, по-видимому, снимался высокими дозами нейролептических средств. В другом предварительном сообщении Гунн и др. [15] приводят данные о действии 0,4 мг налоксона на слуховые галлюцинации у шести больных шизофренией. Эти исследования проводились без использования двойного слепого метода, в связи с чем несколько групп исследователей попытались применить двойной слепой метод к более обширным группам больных и получили в итоге негативные результаты [9, 18, 37]. Мы предприняли аналогичные исследования, отличающиеся от предыдущих экспериментов по трем важным пунктам:

1. При отборе больных мы исходили из многих критериев, выбирая больных с хронической недифференцированной шизофренией или паранойей с продолжительными слуховыми галлюцинациями и легко ранжируемой патологией. Больных оценивали по шкалам рангов NIMH или BPRS и диагностировали у них хроническую шизофрению (параноидную или хроническую недифференцированную), исходя из множества критериев, включающих в себя следующие: указания диагностического и статистического руководства II американской ассоциации психиатров, а также критерии, предложенные Фейнбергом и др. [12] и Тейлором и др. [34]. Половину группы больных поддерживали на стандартном лечении нейролептическими средствами, а вторая половина больных не получала лекарственных препаратов в течение по крайней мере двух недель. Десять больных, у которых исследовали действие налоксо-

на, были отобраны из группы в 1000 больных в госпитале Пало Альто.

2. Доза налоксона (10 мг, внутривенно) в нашем исследовании была в 25 раз выше, чем дозы, которые вводили Гун и др. [15], и значительно выше, чем дозы, использованные во всех исследованиях с негативными результатами. Необходимость в такой высокой дозе основана на двух соображениях: во-первых, эндорфины, как сообщалось, требуют значительно больше налоксона для обращения эффекта, чем эквипотентные дозы опиатных алкалоидов [19]. И во-вторых, опиатные алкалоиды, вызывающие галлюцинации и негативные эмоции у человека, такие, как циклозоцин и SKF 10047, также требуют для обращения в 40—60 раз большие дозы налоксона. Фактически, исходя из таких данных, Мартин и сотр. [25] высказали предположение о множественности популяций опиатных рецепторов.

Таблица 3

Влияние налоксона на беспокойство и галлюцинации у больных шизофренией[1]

	Плацебо	Налоксон
Простой слепой метод, $n=2$	Н — — — — А — — — —	$x=4{,}5\pm1{,}5$ $x=2{,}0\pm1{,}0$
	Плацебо	Налоксон
Двойной слепой метод, $n=8$	Н $x=1{,}0\pm0{,}35$ ($t=2{,}0$ Н.Д.)	$x=2{,}38\pm0{,}68$ ($t=3{,}49$; $p<0{,}02$)
	А $x=0{,}88\pm0{,}77$ ($t=1{,}16$ Н.Д.)	$x=1{,}8\pm0{,}59$ ($t=2{,}96$; $p<0{,}05$)

[1] Средние значения±средняя ошибка в каждом отделении таблицы представляют собой усредненные изменения значений, характерных для условий, обозначенных соответсгвующим лекарственным препаратом. Изменение пунктов представляет собой разницу между базальным числом пунктов по шкале рангов NIMH и таковым через 75—90 мин после инфузии. Чем больше значение, тем сильнее снижение патологии. Н — изменение пунктов при оценке галлюцинаций; А — изменение пунктов при оценке беспокойства. У двух больных, проанализированных простым слепым методом, обнаружены изменение галлюцинаций и беспокойства соответственно на 4,5 и 2,0 пунктов после внутривенной инфузии 10 мг налоксона. У 8 пациентов, проанализированных двойным слепым методом, не обнаружено достоверного эффекта при инфузии плацебо, но обнаружены достоверные изменения в галлюцинациях и беспокойстве после инфузии наколсона.

Н.Д. — не достоверно.

3. Эффекты налоксона наблюдались в течение нескольких часов после инъекции, а не в течение 30—60 мин, как это было в некоторых предшествующих исследованиях. Хотя обращение налоксоном эффектов морфина и героина может быть немедленным, мы показали, что некоторые эффекты налоксона могут быть более

долгодействующими — вплоть до нескольких часов [2]. Возможно, далее, что блокирование опиатных рецепторов может приводить ко вторичным эффектам, выражающимся в изменениях в поведении или эмоциональном состоянии.

Короче говоря, план нашего исследования был следующим: восемь из десяти наших больных обрабатывались по двойной слепой перекрестной программе. Проводили два независимых курса, разделенных по крайней мере двумя днями. В результате каждого курса было получено базальное ранжирование с использованием шкал рангов, ряда градаций галлюцинаций и ряда градаций настроений. Затем проводили инфузию, и больной вновь ранжировался в течение 30 мин и затем в течение 6 ч с 45—60-минутными интервалами. Первых двух больных обследовали с применением простого слепого метода, чтобы увериться в безопасности и выполнимости процедуры. Весь статистический анализ проводился на больных, испытанных по двойному слепому методу.

Данные о влиянии налоксона на результаты подсчета беспокойства и галлюцинаций через 90 мин после инъекции суммированы в табл. 3. Как можно видеть, налоксон в этой дозе оказывает слабое, но статистически достоверное действие на результаты подсчета галлюцинаций и беспокойства. Другие подсчеты остаются неизмененными. Четверо из десяти больных обнаруживали двухфазный ответ на налоксон. При первом обследовании после инфузии у них проявилась умеренная дисфория, беспокойство или слегка повышенная параноидность. Этот эффект прекращался к 45-й минуте, когда больные, о которых идет речь, чувствовали себя «лучше», со снижением галлюцинаций и беспокойства.

Хотя мы считаем эти предварительные результаты обнадеживающими, следует указать на некоторые трудности, присущие выбранному нами плану исследований.

1. У каждого больного проводили несколько измерений — особенность, общая для многих начальных исследований, которая случайным образом увеличивает вероятность ложноположительных результатов.

2. Каждый больной подвергался повторному ранжированию и испытанию. При таком плане нельзя исключить эффекты взаимовлияния и порядка следования испытаний.

3. Галлюцинации представляют собой высоковариабельный феномен и могут изменяться в зависимости от уровней активности больного, социальных взаимодействий, стресса и беспокойства. Весьма реальной является возможность того, что наблюдаемые нами эффекты обусловлены действием налоксона на восприимчивость к стрессу (для сравнения см. выше разделы, посвященные налоксону и стрессу).

4. Налоксон является короткодействующим агентом, даже если эффекты могут наблюдаться в течение нескольких часов после введения. Это исключает возможность иследования постоянства

или надежности некоторых его эффектов, особенно влияющих на внутренне субъективное и изменчивое поведение.

Мы понимаем, таким образом, что, исходя из наших результатов, можно только строить предположения, но отнюдь не делать окончательных выводов. В связи с этим мы выбрали для исследований длительно действующий, принимаемый перорально опиатный антагонист налтрексон (250 мг/день). Это позволяет нам удлинить фазы приема препарата и плацебо до нескольких недель, что в свою очередь обеспечивает длительные наблюдения, стабильность исходного уровня и снижает эффект повторных обследований больных. Предварительные наблюдения в четырех случаях с незашифрованными больными выявили отсутствие существенной токсичности или абстинентных эффектов при дозе в 250 мг. Мы отметили умеренное улучшение у этих больных, основываясь на общем ранжировании и нескольких субкатегориях по шкале рангов NIMH. Хотя по некоторым из этих категорий наблюдаемые изменения соответствуют результатам, полученным в опытах с налоксоном, никаких окончательных выводов мы делать не можем до тех пор, пока мы не закончим проводящиеся сейчас рандомизированные перекрестные исследования двойным слепым методом.

В заключение можно сказать следующее: мы понимаем, что действие более высоких доз опиатных антагонистов на выбранную популяцию больных с психотическими состояниями заслуживает длительного и тщательного исследования.

Заключение

В настоящей статье мы наметили несколько направлений исследований, касающихся роли эндогенных опиоидов и родственных пептидов в функционировании мозга. Мы описали методы экстракции и определения этих веществ, позволяющие проводить анализ большого количества малых образцов. Результаты анатомического исследования свидетельствуют о дифференциальном распределении β-липотропиновых и энкефалиновых трактов, тогда как АКТГ-подобная реактивность оказывается параллельной активности β-ЛПГ в мозгу крыс. Физиологические и фармакологические исследования подтвердили представление о роли энкефалинов и эндорфинов в модуляции боли и реактивности на стресс у крыс и человека. Однако их взаимодействие не поддается описанию в рамках простых моделей. Например, налоксон частично блокирует индуцированную стрессом анальгезию, толерантность же к морфину приводит к резкому усилению этого феномена. Анальгезивная электрическая стимуляция участков медиального серого вещества приводит к достоверным, зависящим от времени изменениям в содержании энкефалина в мозгу крыс и увеличению его содержания в

СМЖ при заболеваниях, сопровождающихся болью. И наконец, клинические исследования с налоксоном и шизофренией показывают достоверное снижение частоты галлюцинаций и беспокойства через 90—120 мин после инъекции, что наводит на мысль о роли эндогенных опиоидов в развитии психических расстройств.

Список литературы

1. *Akil H.* In: Neuroregulators and Psychiatric Disorders, eds. by E. Usdin, D. A. Hamburg and J. D. Barchas, pp. 319—328, Oxford, pp. 319—328, Oxford University Press, New York (1977).
2. *Akil H., Madden J., Patrick R., Barchas J. D.* Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 63—70, Elsevier/North Holland Pub. Co., Amsterdam (1976).
3. *Akil H., Mayer D. J., Liebeskind J. C.* Science, **191**, 961—962 (1976).
4. *Akil H., Richardson D. E.* J. Neurosurg., **47**, 178—183 (1977).
5. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
6. *Beluzzi J. D., Grant N., Garsky V., Sarantakis D., Wise C. D., Stein L.* Nature, **260**, 625—626 (1976).
7. *Beluzzi J. D., Stein L.* Nature, **266**, 556—557 (1977).
8. *Buscher H. H., Hill R. C., Romer D., Cardinaux F., Clone A., Hauser D., Pless J.* Nature, **261**, 423—425 (1976).
9. *Davis G. C., Bunney W. E., DeFraites E. G., Kleinman J. E., van Kammen D. P., Post R. M., Wyatt R. J.* Science, **197**, 74—77 (1977).
10. *Eipper B. A., Mains R. E., Guenzi D.* J. Biol. Chem., **251**, 4121—4126 (1976).
11. *Elde R., Hökfelt J., Johansson O.. Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
12. *Feighner J. R., Robins E., Guze S. B., Woodruff R. A., Jr., Winokur C., Munoz R.* Arch. Gen. Psychiatry, **26**, 57—63 (1972).
13. *Fratta W., Yang T., Hong J., Costa E.* Nature, **268**, 452—453 (1977).
14. *Graf L., Szekely J. I., Ronai A. Z., Dunal-Kovacs Z., Bajusz S.* Nature, **263**, 240—241 (1976).
15. *Gunne L.-M., Lindstrom L., Terenius L.* J. Neural. Transmission, **40**, 13—19 (1977).
16. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neuroscience Letters, **5**, 25—31 (1977).
17. *Hosobuchi Y., Adams J. F., Linchitz R.* Science, **197**, 183—186 (1977).
18. *Janowsky D. S., Segal D. S., Bloom F., Abrams A., Guillemin R.* Am. J. Psychiatry, **134**, 926—927 (1977).
19. *Kosterlitz H. W., Hughes J.* In: The Opiate Narcotics: Neurochemical Mechanisms in Analgesia and Dependence, ed. A. Goldstein, pp. 245—250, Pergamon Press, New York (1975).
20. *Krieger D. T., Liota A., Brownstein M. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 648—652 (1977).
21. *Li C. H., Barnafi L., Chretien M., Chung D.* Exerpta Medica, **3**, 111—112 (1965—1966).
22. *Liebeskind J. C., Mayer D. J., Akil H.* In: Advances in Neurology, vol. 4, Pain, pp. 261—268, Raven Press, New York (1974).
23. *Madden J., Akil H., Patrick R. L., Barchas J. D.* Nature, **266**, 358—360 (1977).
24. *Mains R. E., Eipper B. A., Ling N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 3014—3018 (1977).
25. *Martin W. R., Eades G. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **197**, 518—532 (1976).
26. *Mayer D. J., Wolfle T. L., Akil H., Carder B., Liebeskind J. C.* Science, **174**, 1351—1354 (1971).
27. *Oliveras J. L., Hosobuchi Y., Redjemi F., Guilbaud G., Besson J. M.* Brain Res., **120**, 221 (1977).

28. *Pelletier G., Leclerc R., Labrie F., Cote J., Chretien M., Lis M.* Endocrinology, **100**, 770—776 (1977).
29. *Rao A. J., Li C. H.* Int. J. Peptide. Protein, **10**, 169 (1977).
30. *Richardson D. E., Akil H.* J. Neurosurg., **47**, 184—194 (1977).
31. *Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G.-R., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 2167—2171 (1977).
32. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, Elsevier/North Holland Press/Amsterdam (1976).
33. *Sullivan S., Akil H., Watson S. J., Barchas J. D.* Society for Neurosciences Abstracts III, **972**, 302 (1977).
34. *Taylor M. A., Abrams R., Gaztanaga P.* Comp. Psychiat., **16**, 91—96 (1975).
35. *Terenius L., Wahlstrom A.* Life Sci., **16**, 1759—1764 (1975).
36. *Terenius L., Wahlstrom A., Lindstrom L., Widero V.* Neurosci. Letters, **3**, 157—162 (1976).
37. *Volavka J., Mallya A., Baig S., Perez-Cruet, J.* Science, **196**, 1227—1228 (1977).
38. *Watson S. J., Akil H., Sullivan S. O., Barchas J. D.* Life sci., **21**, 733—738.
39. *Watson S. J., Barchas J. D., Li C. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, in press.
40. *Wei E., Loh H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 303—310, Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
41. *Yaksh T. L., Yeung T. C., Rudy T. A.* Life Sci., **18**, 1193—1198 (1976).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПОД ВЫСОКИМ ДАВЛЕНИЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭНКЕФАЛИНОВ

Дж. Л. МИК, Т. П. БОХАН

(J. L. Meek, T. P. Bohan)

Большая часть исследований эндогенных лигандов опиатных рецепторов проведена с использованием традиционных биологических методов, иммунологических тестов и тестов на связывание с рецепторами. Жидкостная хроматография под высоким давлением (ЖХВД) может служить ценным дополнительным методом в таких исследованиях, поскольку она дает возможность физически разделить очень близкородственные соединения. Мы использовали возможности разделения ЖХВД для оценки содержания мет-энкефалина в мозгу и кишечнике и для изучения катаболизма мет- и лей-энкефалина. Ввиду широкого диапазона уже известных и пока еще не обнаруженных эндогенных соединений, обладающих высоким сродством к опиатным рецепторам, бывает трудно установить, не являются ли значения, полученные каким-либо одним аналитическим методом, ошибочно завышенными из-за наличия в исследуемой ткани каких-либо соединений, искажающих результаты определения. Так, например, содержание мет-энкефалина в полосатом теле крыс определяют с помощью радиоиммунологического теста, обладающего пренебрежимо малой перекрестной реактивностью для α- и β-эндорфина и лишь слабой перекрестной реактивностью для лей-энкефалина [10]; однако вполне возможно, что в тест-материале имеются какие-то другие, не обнаруживаемые нами соединения, влияющие на результаты определения содержания энкефалинов в мозгу с помощью радиоиммунологического теста; чтобы подтвердить результаты, полученные при определении, мы использовали ЖХВД для фракционирования и связывание с рецепторами для количественного определения эндорфинов.

Мы использовали также ЖХВД для измерения содержания мет-энкефалина в кишечнике морских свинок. Наш выбор пал на эту ткань из-за ее способности к переживанию in vitro, что значительно облегчает исследования синтеза и высовобождения энкефалина.

Методы

Разделение в системах ЖХВД проводили на короткой колонке (25—50 см), равномерно заполненной мелкими частицами (<30 мкм). Маленький размер частиц обеспечивает высокое разрешение и быструю кинетику обмена, но их использование требует применения насосов высокого давления для элюирующих растворов (подвижная фаза) [9]. Обычно определение количества элюируемых соединений производится непрерывно с использованием какого-либо детектора — ультрафиолетового, флуоресцентного, определяющего показатель преломления или электрохимического. К сожалению, ни один из этих детекторов не обладает требуемым сочетанием чувствительности и специфичности, которая обеспечила бы измерение малых количеств эндогенных пептидов в экстрактах тканей, содержащих очень большие количества других соединений. В связи с этим мы использовали электрохимический детектор только для установления характера элюции аутентичных стандартов, тогда как для действительного выявления опиатоподобных соединений из экстрактов тканей мы исследовали элюируемые фракции по тесту на связывание с опиатными рецепторами. Хроматографическая система [4] состояла из мини-насоса Milton Roy, перегородочного инжектора, стеклянной колонки размером 0,5 м× ×2,1 мм, заполненной катионообменной смолой Dupon SCX, и электрохимического детектора Bioanalytical Systems (West Lafayette, Ind.) Этот детектор измеряет ток, возникающий при электрическом окислении соединений на поверхности угля. Разделение проводилось с фосфатом натрия в качестве подвижной фазы (0,1 М, pH 6,0), прокачиваемого со скоростью 0,66 мл/мин (350—500 атм). При pH 6 пептид Tyr-Gly-Gly-Phe лишь слегка задерживается колонкой и элюируется вслед за свободным объемом (время удержания 1 : 0,5). Мет- и лей-энкефалин полностью отделяются друг от друга и от пептида Tyr-Gly-Gly-Phe и элюируются с временами удержания 3 : 20 и 6 : 55. При этих условиях следующий, более длинный гомолог мет-энкефалина Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, а также α- и β-эндорфины полностью задерживаются колонкой (удержание более 30 мин).

Хроматография образцов ткани требует концентрирования экстрактов в небольшие объемы для инжекции и удаления субклеточных частиц и высокомолекулярных соединений, снижающих эффективность разделения на колонке. Для выделения мет-энкефалина из ткани кишечника ткань (2 г) гомогенизировали в 5 объемах бутанола, содержащего 1 мл HCl на 100 мл бутанола и избыток кристаллического NaCl. После центрифугирования бутанольную фазу смешивали с гептаном и экстрагировали водным раствором муравьиной кислоты (0,4 н). Водную фазу лиофилизировали и полученный остаток вновь растворяли в 200 мкл $HClO_4$. pH раствора доводили до 4—5 с помощью 2 М ацетата калия и аликво-

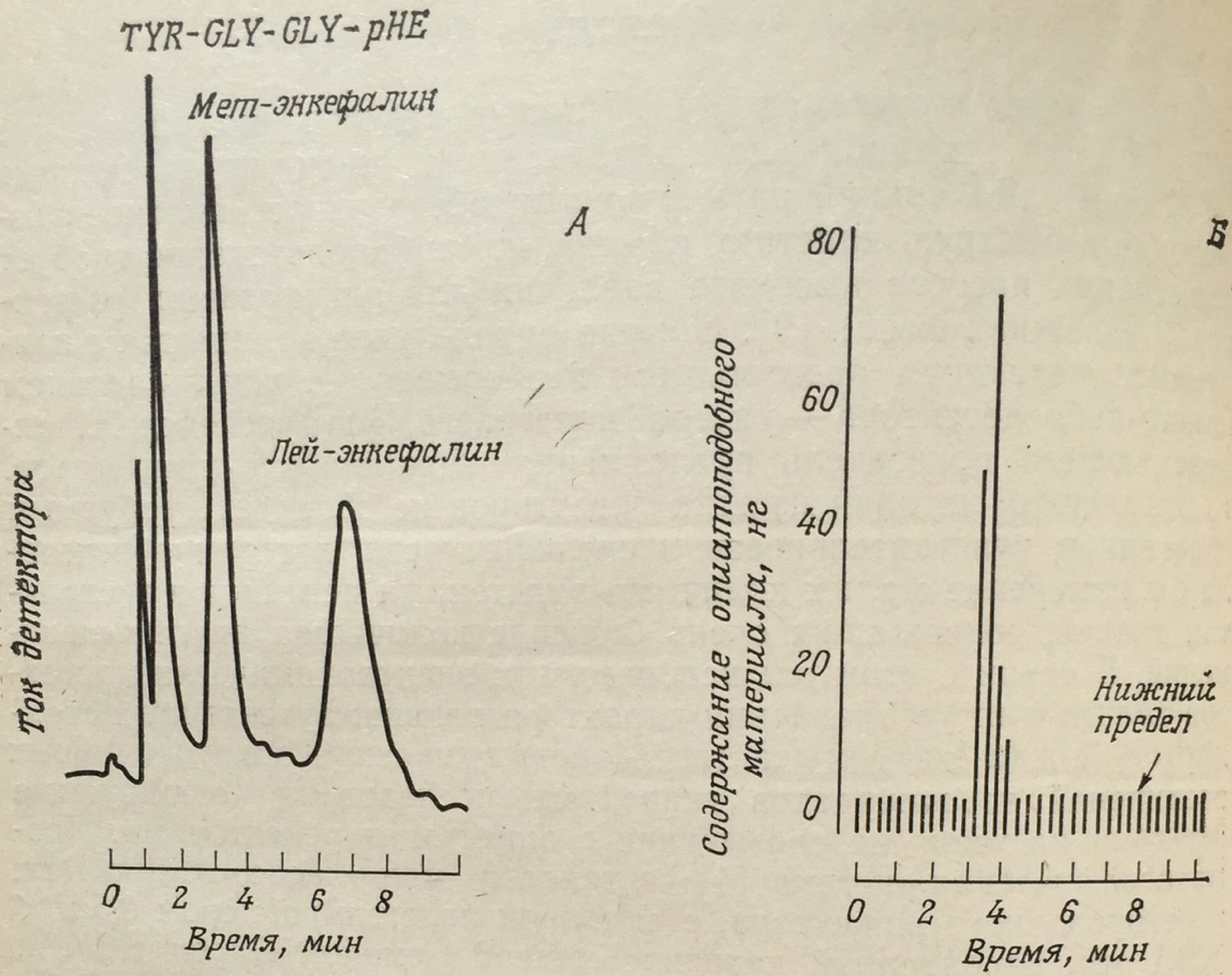


Рис. 1. Профили элюции аутентичных пептидов (*А*; получены с помощью электрохимического детектора) и материала из ткани кишечника морской свинки (*Б*; получен с использованием теста на опиатные рецепторы для обнаружения пептидов).

ту в 80 мкл инжецировали в хроматограф. Порции элюата с колонки анализировали в тесте связывания с опиатными рецепторами [1]. Определение мет-энкефалина в экстрактах полосатого тела крыс можно проводить на меньшем количестве ткани (100 нг), причем оно не требует предварительного экстрагирования бутанолом, поскольку энкефалины более сконцентрированы в полосатом теле, чем в ткани кишечника. Полосатое тело крыс, забитых микроволновым облучением, гомогенизировали непосредственно в муравьиной кислоте (0,4 н) и экстракт лиофилизовали. Общий выход мет-энкефалина, добавленного к кишечнику, составлял 50—60%, а выход из мозга — 85%.

Результаты

На рис. 1 показан профиль элюции аутентичных стандартов, мет- и лей-энкефалина, и профиль элюции энкефалиноподобного материала из кишечника морской свинки. Тест на связывание элюата, полученного при хроматографировании кишечного экстракта, выявил один пик с временем удержания, идентичным таковому для аутентичного мет-энкефалина. Никакого опиатоподобного материала не обнаруживается, однако, в области элюата, соответствующей лей-энкефалину. Эта неспособность обнаружить лей-энкефалин обусловлена, по-видимому, меньшей чувствительностью рецепторного теста в отношении лей-энкефалина, более низкой концентрацией в тканях лей-энкефалина и бо́льшим разведением образца, обусловленным уширением пика в области лей-энкефалина (рис. 1).

Таблица 1

Концентрация мет-энкефалина в тонком кишечнике морских свинок[1]

Ткань	Концентрация мет-энкефалина, нг/г
Привратник	75±8,9
Верхняя часть тощей кишки	67±10
Нижняя часть тощей кишки+верхняя часть подвздошной кишки	77±18

[1] N=9. Ткани гомогенизировали в бутаноле сразу после выделения.

Содержание мет-энкефалина в различных участках кишечника морской свинки приведено в табл. 1. Концентрации оказываются сходными вдоль всей длины тонкого кишечника. Равновесная концентрация этого энкефалина в кишечнике может поддерживаться при инкубации in vitro (табл. 2).

Таблица 2

Концентрации мет-энкефалина в кишечнике морских свинок после попытки подавить его синтез in vitro[1]

Условия инкубации	Концентрация мет-энкефалина в ткани, нг/г
Раствор Тироде с аминокислотами	64±4,8
Раствор Тироде без аминокислот+циклогексимид (10^{-4} M)+ингибитор трипсина из яичного белка (0,1 мг/мл)	67±7,6

[1] N=4. Ткань от двух морских свинок собирали, разделяли на 8 образцов и инкубировали в течение 6 ч.

Чтобы выяснить, обеспечивается ли постоянство концентрации непрерывным быстрым синтезом, мы попытались блокировать синтез энкефалина, удаляя из инкубационного буфера аминокислоты и добавляя ингибитор синтеза белка (циклогексимид) и ингибитор трипсина и химотрипсина (табл. 2). Добавление последнего ингибитора было связано с тем, что мет-энкефалин может образовываться в результате триптического расщепления β-липотропина или других предшественников. Использованные нами условия не оказывали видимого влияния на концентрацию мет-энкефалина; следовательно, динамика запасания мет-энкефалина не поддерживается ни рибосомным синтезом белка, ни неспецифическим гидролизом пептидных связей. Возможно, однако, что выбранные условия не приводят к подавлению синтеза энкефалина. Нельзя, однако, исключить и другую возможность — существование большого запаса предшественника(ов) энкефалина, при образовании из которого энкефалин может выщепляться благодаря процессу, не подавляемому ингибитором трипсина.

При анализе материала, полученного из полосатого тела крысы, характер элюции оказывается сходным с тем, который приведен на рис. 1, с той лишь разницей, что обнаруживается более высокое содержание мет-энкефалина. И в этом случае эндогенные лиганды опиатных рецепторов, обнаруживаемые в элюате с колонки, обладают таким же временем удержания, как и мет-энкефалин, и при этом не обнаруживается материала, влиявшего бы на связывание налоксона и обладавшего бы временем удержания, характерным для лей-энкефалина. Для количественного определения концентрации мет-энкефалина в мозгу были получены экстракты от 8 крыс, забитых микроволновым облучением. Концентрация мет-энкефалина в полосатом теле крыс оказалась равной 1,3±±0,18 мкг/г ткани (N=8), что соответствует данным Янга и др. [10].

Катаболизм энкефалина исследовали in vivo и in vitro [4]. Мы использовали ^{3}H-мет-энкефалин, поскольку его легко отделить от любых возможных метаболитов, содержащих тирозин. In vitro мет-энкефалин легко разрушается аминопептидазой, которую можно ингибировать *о*-фенантролином. Высвобождение тирозина путем гидролиза N-концевой пептидной связи происходит по крайней мере в 40 раз быстрее, чем гидролиз С-концевой связи. Для изучения катаболизма мет-энкефалина in vivo ^{3}H-мет-энкефалин без носителя инъецировали внутрижелудочково. Более чем 95% мет-энкефалина разрушалось в течение менее чем 1 мин.

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что, используя ЖХВД, можно отделить лей-энкефалин от мет-энкефалина. Ограниченность этого метода также очевидна: трудно измерить с достаточно высокой степенью специфичности и чувствительности концентрацию пептидов в элюате с колонки, используя химические или физические методы. Так, например, Грубер и др. [3] смогли выявить окситоцин и вазопрессин в гипофизе, получая флуоресцентные производные с флуоресцамином; однако концентрация этих пептидов в ткани на порядок выше, чем концентрации, обнаруженные для других пептидов в мозгу. Представляется вероятным, что дальнейшая разработка детекторов, таких, как ртутный адсорбционный детектор для сульфгидрильных групп [6], которая позволит повысить чувствительность колонок или улучшит их селективность, значительно революционизирует эту область исследований. В настоящее время, однако, отсутствие подходящих колонок создает дополнительные трудности, осложняющие применение ЖХВД в качестве общего метода изучения пептидов. Силикагель, используемый обычно для исследования низкомолекулярных соединений, имеет тенденцию адсорбировать белки, что исключает возможность его использования в качестве молекулярного сита. Ни один из материалов, полученных на основе декстрана (сефадексы, которые не адсорбируют белков), не обладает достаточной жесткостью, чтобы обеспечить разделение под высоким давлением. Обнадеживающими являются работы на несжимаемых набивках [2], равно как и эксперименты со слабым анионообменником (ДЭАЭ-силикагель). Сильные катионообменные колонки, как показано в нашей статье, могут быть использованы для разделения некоторых небольших пептидов, но в случае белков или пептидов, содержащих многочисленные катионные остатки, их использование сталкивается с определенными трудностями. Обратнофазная хроматография представляется наиболее обнадеживающим методом для разделения пептидов и белков методом ЖХВД, поскольку имеются колонки с высокой эффективностью и слабой тенденцией к необратимой адсорбции белков. Однако предстоит еще много трудиться для разработки общего приемлемого метода. В настоящее время разделение пептидов может проводиться на основе принципа «от случая к случаю», поскольку многочисленные функциональные группы в молекуле создают громадные сложности в ее удержании. В случае, описанном в нашей статье, выбранная набивка колонки задерживала энкефалины благодаря сочетанию липофильной адсорбции и катионного обмена. Значение pH для разделения было выбрано таким образом, чтобы обеспечить резкое изменение удержания энкефалинов в зависимости от pH: при pH 5 энкефалины удерживаются полностью, а при pH 7 не удерживаются совсем. Сдвиг обусловлен подавлением ионизации карбоксильных групп. Хотя значение p*K* карбоксильных групп большинства пептидов лежит в области 3—4, энкефалины, по-видимому, обладают вторичной структурой, влияющей на их ионизацию.

Тест, который мы использовали для определения мет-энкефалина в полосатом теле (стриатуме), полностью отличается от иммунологического теста, использованного Янгом и др. [10], но полученные значения оказались сопоставимыми. Следовательно, эти значения близки, по-видимому, к истинным. Если предположить, что они правильны, то значения, полученные Синантовом и Снайдером [7], оказываются более чем на порядок ниже; причиной такого расхождения является, по-видимому, низкий выход. С помощью биотеста Смит и др. [8] обнаружили 55 нг/г мет-энкефалина в подвздошной кишке морской свинки; это значение близко к установленному в наших экспериментах. Получены также данные о присутствии энкефалиноподобной иммунореактивности в кишечнике человека.

Предварительные исследования высвобождения энкефалина из кишечника морской свинки дают основание надеяться, что эту систему можно будет использовать в качестве модели для изучения синтеза энкефалина. Установив зависимость высвобождения от времени, можно провести эксперименты, в которых будет выяснено, происходит ли синтез этих соединений. Затем можно провести эксперименты, позволяющие выяснить, как происходит синтез: de novo или из предобразованного предшественника? Далее представляется возможным добраться до нейронных петель, регулирующих высвобождение энкефалина в кишечнике. Для этого следует проследить высвобождение энкефалина после аппликации различных существующих, как известно, в ткани кишечника агонистов постсинаптических рецепторов (таких, как ацетилхолин, серотонин или норадреналин).

Список литературы

1. *Chang J. K., Fong B. T., Pert A., Pert C. B.* Life Sciences, **18**, 1973—1982 (1976).
2. *Chang S. H., Gooding K. M., Regnier F.* J. Chromatog., **125**, 103—114 (1976).
3. *Gruber K. A., Stein S., Brink C.. Radhakrishnan K., Udenfriend S.* Proc. Natl. Acad. Sci., **73**, 1314—1318 (1976).
4. *Meek J. L., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacol., **16**, 151—154 (1977).
5. *Polak J. M., Sullivan S. R., Bloom S. N., Facer P., Pearse A. G. E.* Lancet I, 972 (1977).
6. *Rabenstein D. L., Saetre R.* Anal. Chem., **49**, 1036—1039 (1977).
7. *Sinantov R., Snyder S. H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 41—48, North Holland, New York (1976).
8. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, North Holland, New York (1976).
9. *Snyder L. R., Kirkland J. J.* Introduction To Modern Liquid Chromatography. Wiley, New York (1974).
10. *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacol., **16**, 303—307 (1977).

ЭНКЕФАЛИНЫ МОЗГА КРЫС. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И БИОСИНТЕЗ

Х.-Ю. Т. ЯНГ, Дж. С. ХОНГ, В. ФРАТТА, Е. КОСТА

(H.-Y. T. Yang, J. S. Hong, W. Fratta, E. Costa)

В 1975 году Хьюс и др. [7] выделили из мозга свиней и химически охарактеризовали два пентапептида — мет- и лей-энкефалины. С тех пор накоплены данные, свидетельствующие о существовании энкефалинэргической нервной передачи, но точная физиологическая роль этих пептидов еще не выяснена. После открытия энкефалинов было установлено существование другой группы эндогенных лигандов для этих опиатных рецепторов: эти лиганды получили название «α-, β- и γ-эндорфины» [1, 5, 8, 9]. Для исследования роли, которую играют энкефалины в нервной передаче, мы разработали чувствительный и специфический метод измерения энкефалинов в небольших дискретных участках мозга крыс и предложили относительно простой метод, позволяющий измерять включение ^{3}H-тирозина или ^{3}H-глицина в энкефалин мозга крыс. Мы расцениваем полученные нами результаты как достаточно обнадеживающие для дальнейшего развития такого подхода к изучению действия лекарственных препаратов на энкефалинэргическую передачу.

Методы

Радиоиммунологический тест. Распределение энкефалина в мозгу крыс определяли с помощью описанного ранее иммунологического теста [11]. Вследствие слабой перекрестной реактивности между лей-энкефалином и антителами к мет-энкефалину и между мет-энкефалином и антителами к лей-энкефалину мы для подтверждения результатов определяли содержание энкефалинов в полосатом теле (стриатуме) с помощью радиоиммунологического теста после разделения энкефалинов жидкостной хроматографией под высоким давлением (ЖХВД). Эта процедура была выполнена докторами Мик и Бохан (см. данное издание).

Включение радиоактивной метки в мет-энкефалин мозга. ^{3}H-глицин (15 Ки/ммоль) или ^{3}H-тирозин (15 мКи/ммоль) вводили путем инфузии в латеральный желудочек мозга крыс в дозе 150 мкКи (30 мкл) на крысу в течение 30 мин. Крыс забивали сфокусированным микроволновым облучением через различные интервалы времени после окончания инфузии. Участки мозга экстрагировали 0,1 н уксусной кислотой. Экстракты нейтрализовали 1 н. NaOH и затем выделяли меченый мет-энкефалин аффинной хроматографией на колонке с антисывороткой.

Аффинная хроматография на колонке с антисывороткой к мет-энкефалину. Колонка с антисывороткой к мет-энкефалину была приготовлена путем конъюгации частично очищенной антисыворотки к мет-энкефалину или контрольной сыворотки с активированной бромцианом сефарозой 2В. Экстракты ткани (конечная концентрация 0,2 М *трис*-буфер, pH 7,4, содержащий 0,1% альбумина и 0,06% декстрана) наносили на аффинные колонки (0,7×10 см). Колонки промывали тем же буфером до полного исчезновения из элюата радиоактивности. После этого колонки элюировали 2 н. уксусной кислотой до полного освобождения от радиоактивности. Радиоактивность элюата определяли с помощью сцинтилляционного спектрометра. Такие же экстракты ткани, как и нанесенные на колонки с сефарозой — антисывороткой, фракционировали на колонках с сефарозой — контрольной сывороткой и элюируемую радиоактивность использовали в качестве нулевой точки для вычисления количества меченого мет-энкефалиноподобного иммунореактивного материала. Для идентификации меченого энкефалина экстракт, полученный с помощью 2 н. уксусной кислоты, лиофилизовали, экстрагировали абсолютным этанолом и меченый мет-энкефалин сравнивали с аутентичным мет-энкефалином тонкослойной хроматографией на силикагеле G.

Результаты

Антисыворотка высокоспецифична, поскольку она не обнаруживает перекрестной реакции с α- и(или) β-эндорфинами и другими аналогами энкефалина, взятыми в концентрациях, превышающих в $2 \cdot 10^3$ раза концентрации мет-энкефалина. Были проверены следующие пептиды: Tyr-D-Ala-Gly-Leu-Leu; Tyr-D-Ala-Gly(+)-Phe-Gly-Leu; Met-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Met; Tyr-D-Ala-Ser-Phe-Leu; Met-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu; Tyr-D-Ala-D-Pro-Phe-Leu; Tyr-D-Ala-Gly-D-Phe-Leu; Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-Thr; Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Met-Thr; Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Tyr-Gly. Однако антитела обнаруживают примерно 10%-ную перекрестную реакцию с лей-энкефалином.

Использование радиоиммунологических тестов на мет-энкефалин (мет-энк) оказывается чрезвычайно чувствительным (рис. 1) и весьма надежным методом (табл. 1). Для оценки надежности определения мет-энкефалина этим методом радиоиммунологиче-

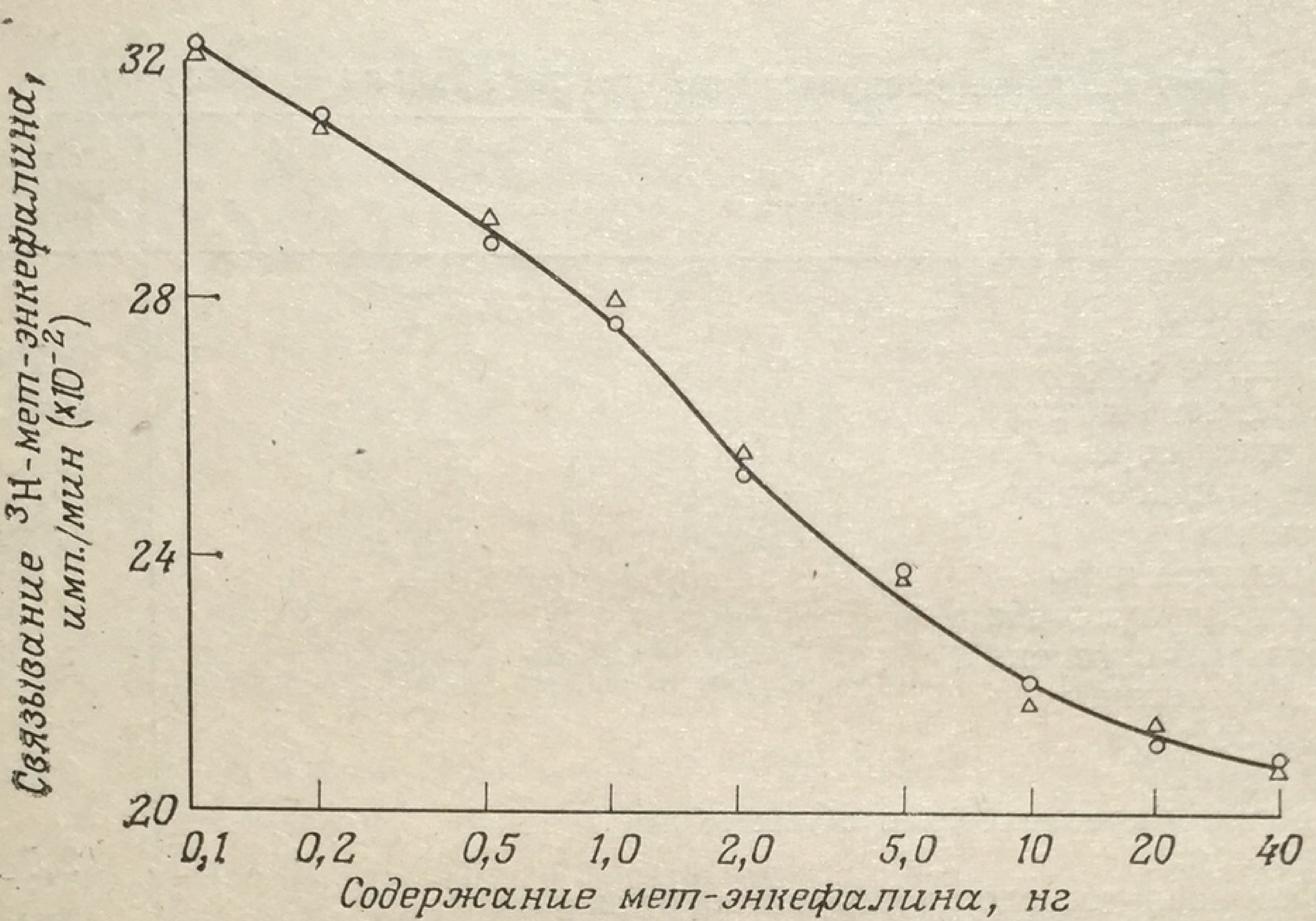


Рис. 1. Стандартная кривая для мет-энкефалина, для построения которой была использована в качестве контроля ткань гипоталамуса (○) и полосатого тела (△).

ски определяли содержание мет-энкефалина в различных количествах экстракта ткани. Наблюдается линейная зависимость между количеством ткани и измеряемым количеством энкефалина (табл. 1). Обнаруживаются заметные различия в содержании мет-

Таблица 1

Радиоиммунологический тест на мет-энкефалин в различных количествах экстракта ткани

Участок		Стриатум				Гипоталамус			
Количество мозга, мг белка		0,2	0,4	0,6	1,0	0,2	0,3	0,4	0,5
Мет-энкефалин	Общее содержание, нг	1,5	3,5	5,0	8,4	0,9	1,1	1,3	1,9
	Относительное содержание, нг/мг белка	7,5	8,8	8,3	8,4	4,5	3,7	3,3	3,8

энкефалина в различных участках мозга. Как показано в табл. 2, содержание мет-энкефалина в стриатуме очень высоко, а в бледном шаре концентрация энкефалина составляет 76 пг/мг белка — наивысшая концентрация среди изученных 34 участков мозга. Содержание мет-энкефалина оказывается также высоким в аккумбентном ядре, в области гипоталамуса и в преоптической области.

Таблица 3

Региональное распределение мет-энкефалина в мозгу крыс

Участок	Содержание мет-энкефалина, нг/мг белка
Белое вещество	
Мозолистое тело	0,79±0,15
Кора головного мозга	0,98±0,12
Лимбическая кора	
Миндалевидное ядро	5,8±0,8
Гиппокамп	0,64±0,12
Аккумбентное ядро	10±1,6
Обонятельная луковица	1,3±0,12
Обонятельный бугорок	2,0±0,28
Базальный ганглий	
Хвостатое ядро	10±1,2
Бледный шар	76±16
Перегородка и преоптическая область	
Перегородка	2,7±0,27
Интерстициальное ядро концевой полоски	6,5±1,6
Медиальное преоптическое ядро	6,5±1,6
Латеральное преоптическое ядро	4,2±1,2
Гипоталамус	
Переднее гипоталамическое ядро	6,6±1,3
Латеральное гипоталамическое ядро	5,0±1,5
Вентральное гипоталамическое ядро	5,4±1,1
Дорсальное гипоталамическое ядро	3,7±0,8
Заднее гипоталамическое ядро	3,5±0,48
Мамилярное тельце	2,2±0,36
Таламус	
Медиальное таламическое ядро	1,6±0,19
Латеральное таламическое ядро	0,69±0,09
Вентральное таламическое ядро	0,75±0,12
Уздечка	
Средний мозг	
Дорсальное ядро шва	2,9±0,44
Медиальное ядро шва	2,0±0,24
Красное ядро	1,0±0,12
Интерпедункулярное ядро	5,8±1,1
Substantia nigra	0,66±0,07
Верхний бугорок	0,5±0,05
Нижний бугорок	0,8±0,12
Периакведуктальное серое вещество	3,9±0,6
Латеральное ядро моста	0,32±0,06
Мозжечок	0,47±0,05
Продолговатый мозг	2,5±0,5

Мозжечок и гиппокамп характеризуется самыми низкими концентрациями энкефалина. Гипофизэктомия не изменяет содержания мет-энкефалина в мозгу. Следовательно, мет-энкефалин мозга, даже в гипоталамусе, происходит не из гипофиза (табл. 3).

Ранее мы изучали распределение одновременно мет- и лей-энкефалина в семи участках мозга, рассеченного по Гловински и

Таблица 3

Содержание мет-энкефалина у гипофизэктомированных и ложнооперированных крыс[1]

Участок мозга	Содержание мет-энкефалина, нг/мг белка		Доля ложнооперированных крыс, %	P
	ложно-оперированные крысы	гнпофизэктомированные крысы		
Перегородка	2,7±0,35	3,5±0,5	131,5	Н. Д.
Бледный шар	72±10	74±12	102,8	Н. Д.
Хвостатое ядро	10±1,0	9,6±1,5	96,1	Н. Д.
Гипоталамус	5,7±1,1	5,4±1,2	94,6	Н. Д.

[1] Результаты получены через 7 сут после операции и представлены как среднее значение±средняя ошибка (N=6). Н.Д. — различия недостоверны.

Иверсену [3], и обнаружили, что в изучаемых участках содержится в 5—10 раз больше мет-энкефалина, чем лей-энкефалина [11]. Такое соотношение между содержанием мет- и лей-энкефалина подтвердилось после разделения мет- и лей-энкефалина с помощью ЖХВД (табл. 4).

Поскольку морфин связывается с участками, которые в физиологических условиях насыщены эндогенными опиатными лигандами, такими, как энкефалины [7], мы решили проверить, сможет ли хроническое воздействие морфином изменить содержание мет-энкефалина в мозгу крыс. Ранее мы изучали содержание мет-энкефалина в структурах мозга, зависимых от морфина или подвергнутых стрессу (шок конечностей) крыс [2]. Равновесное содержание мет-энкефалина в мозгу не изменяется у крыс, ставших толерантными или зависимыми от морфина. Более того, при стрессорном воздействии (шок конечностей) содержание мет-энкефалина в стриатуме крыс не изменяется; следовательно, биохимический сигнал, обусловленный постоянной насыщенностью опиатных рецепторов, может не представлять собой изменения содержания эн-

Таблица 4

Радиоиммунологический тест на энкефалины после разделения мет- и лей-энкефалина жидкостной хроматографией высокого давления (ЖХВД)[1]

	Содержание мет-энкефалина, нг/мг белка	Содержание лей-энкефалина, нг/мг белка	Лей-энкефалин/мет-энкефалин
До ЖХВД	9,2±1,7	1,3±0,26	0,14
После ЖХВД	6,9±0,7	1,4±0,1	0,20

[1] Использован стриатум мозга крысы. Среднее значение± средняя ошибка (N=4).

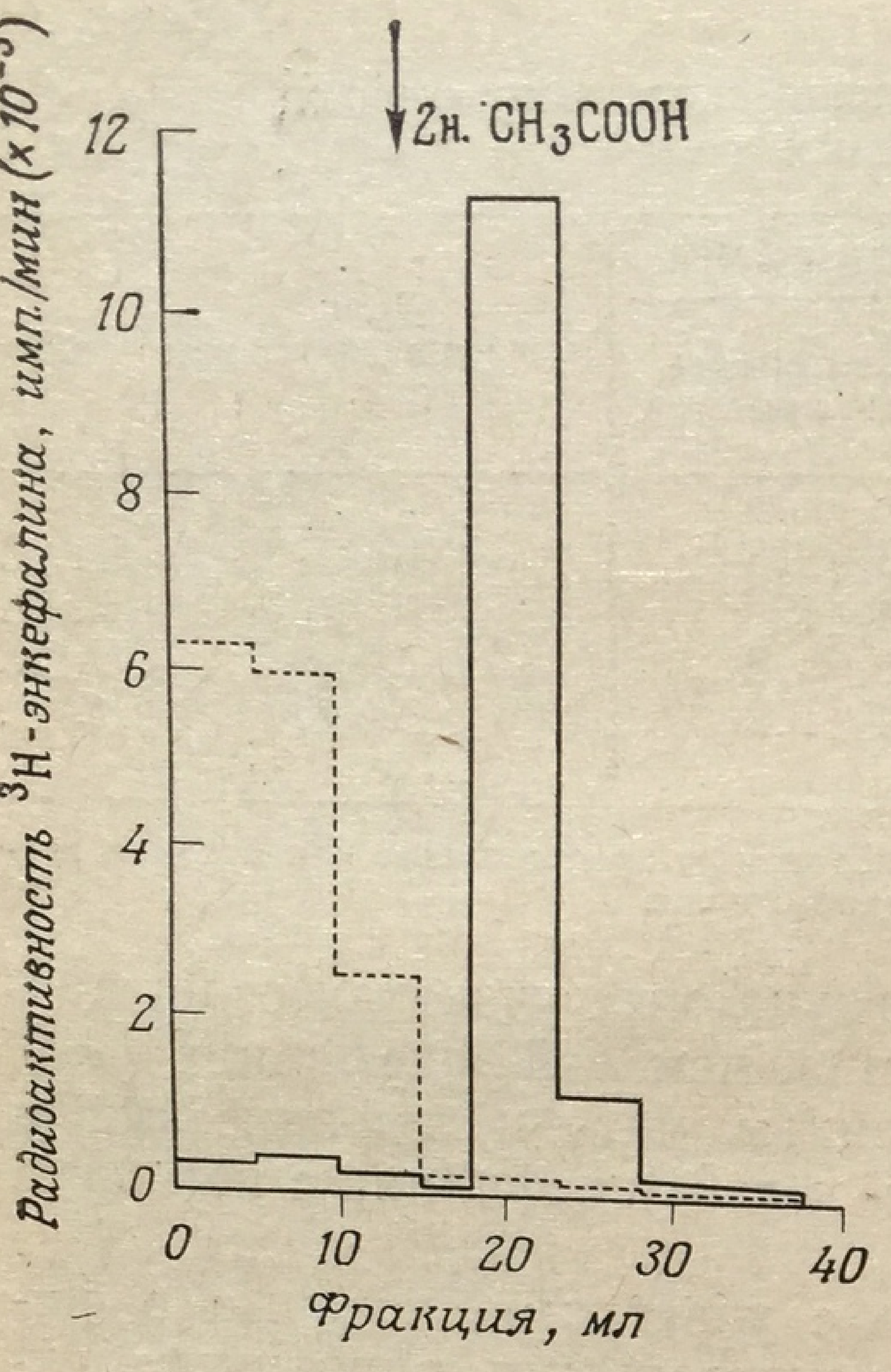


Рис. 2. Выделение мет-энкефалина с помощью хроматографии на колонках с аффинной антисывороткой. Непрерывная линия — сефадекс с антисывороткой, прерывистая линия — сефадекс с контрольной сывороткой. Экстракт ткани двух пар полосатых тел смешивали с ^{3}H-мет-энкефалином (примерно 12 000 имп./мин) и наносили на колонку с антисывороткой (или контрольной сывороткой), иммобилизированной на сефарозе. Элюцию проводили буферным раствором и 2 н. CH_3COOH, как указано в тексте.

кефалинов в мозгу. Возможно, что, как и в случае других предполагаемых медиаторов мозга, энкефалин также отвечает на насыщенность своих рецепторов изменением скорости метаболизма.

Для изучения скорости биосинтеза энкефалина мы вводили меченые аминокислоты и выделяли энкефалины мозга с помощью хроматографии на колонках с аффинной антисывороткой. Как показано на рис. 2, мет-энкефалин задерживается колонкой с сефарозой — антисывороткой и не задерживается колонкой с сефарозой—контрольной сывороткой. Мет-энкефалин, адсорбированный аффинной колонкой, количественно элюируется 2 н. уксусной кислотой. Фракция, получаемая на этом этапе, обозначается как анти-Мет-энк-иммунореактивный материал. Элюаты, полученные 2 н. уксусной кислотой с колонки с сефарозой — антисывороткой и сефарозой — контрольной сывороткой, были исследованы на содержание мет-энкефалина тонкослойной хроматографией на силикагеле G.

Мет-энкефалин, меченный ^{3}H-тирозином, мигрирует вместе с аутентичным мет-энкефалином (рис. 3). При использовании в качестве радиоактивной метки ^{3}H-лейцина наряду с мет-энкефалином обнаружено другое радиоактивное соединение, мигрирующее медленнее, чем мет-энкефалин (рис. 4). Остается выяснить, является ли радиоактивное соединение, мигрирующее с таким же R_f, как и мет-энкефалин, структурно идентичным мет-энкефалину. В качестве первого шага в оценке скорости синтеза энкефалина мы определили скорости включения ^{3}H-тирозина и ^{3}H-глицина в

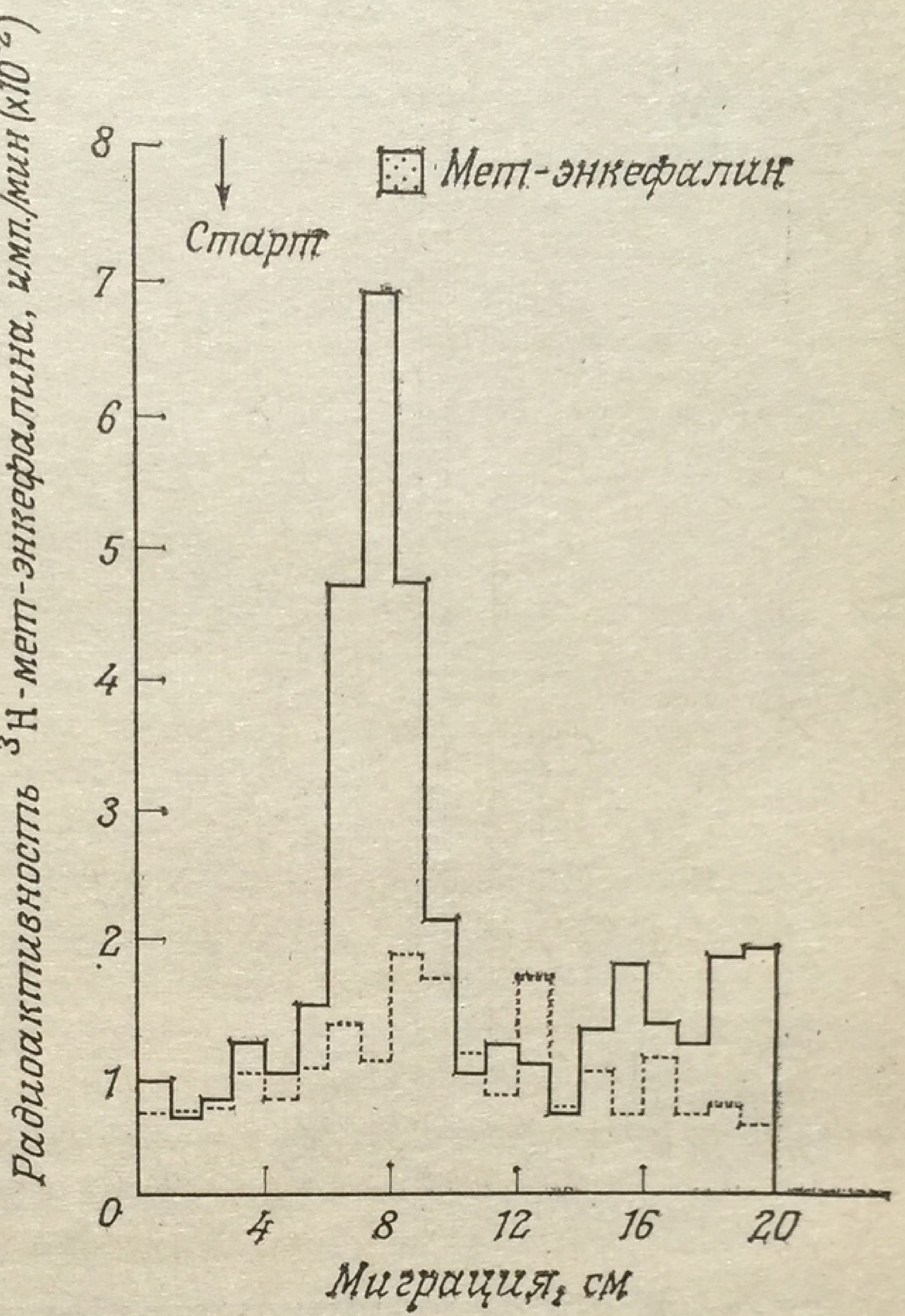


Рис. 3. Идентификация ^{3}H-мет-энкефалина методом тонкослойной хроматографии на силикагеле G после инфузии ^{3}H-тирозина в желудочек мозга.
Четырем крысам проводили инфузию ^{3}H-тирозина, как указано в тексте. Животных забивали через 30 мин после окончания инфузии сфокусированным микроволновым облучением [4]. Экстракты стриатума разделяли на две порции. Одну порцию наносили на колонку с антисывороткой, иммобилизованной на сефарозе, а вторую порцию — на колонку с сефарозой с контрольной сывороткой. Колонки элюировали буферным раствором и затем 2 н. CH_3COOH лиофилизировали, экстрагировали этанолом и наносили на пластинки с силикагелем G. Тонкослойную хроматографию проводили в одном и том же направлении, используя две различные системы растворителей: *н*-бутанол : уксусная кислота: H_2O (60 : 15 : 25) и циклогексан : : бензол : метанол (15 : 85 : 2). Участки силикагеля соскребали с пластинок и определяли их радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Непрерывная линия — сефадекс с антисывороткой, прерывистая линия — сефадекс с контрольной сывороткой.

анти-мет-энк-иммунореактивный материал. Наиболее высокое содержание мет-энкефалина обнаруживается в стриатуме; более того, показано, что стриатум содержит значительное число мет-энкефалиновых интернейронов [6]. В связи с этим мы измерили включение метки в мет-энкефалин, выделенный и очищенный из стриатума и остальной части мозга, без стриатума и мозжечка, через различное время после прекращения введения метки. Образование радиоактивно меченного анти-мет-энк-иммунореактивного материала в стриатуме отчетливо видно при инфузии ^{3}H-глицина (табл. 5).

Максимальное включение ^{3}H-глицина достигается через 15 мин после прекращения инфузии ^{3}H-глицина (табл. 5). Когда радиоактивно меченный мет-энкефалин выделяется из мозга крыс, перфузированного ^{3}H-тирозином, количество радиоактивности, включив-

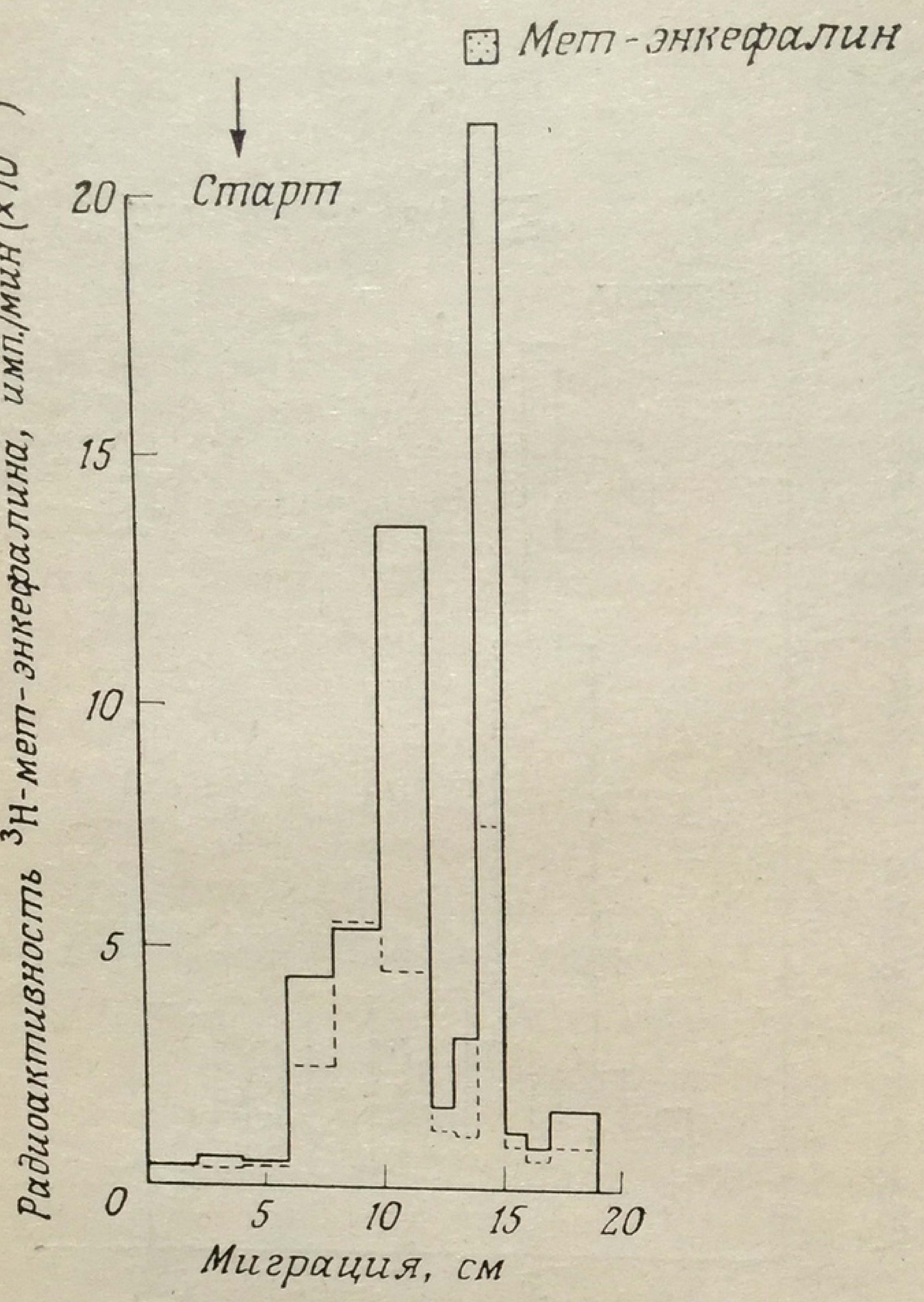


Рис. 4. Идентификация мет-энкефалина, меченного ³Н-глицином, с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. ³Н-глицин вводили путем инфузии в желудочек мозга. Непрерывная линия — сефадекс с антисывороткой, прерывистая линия — сефадекс с контрольной сывороткой.

шейся в анти-мет-энк-иммунореактивный материал в стриатуме, оказывается ниже, чем после инфузии ^{3}Н-глицина (табл. 5). Количество ^{3}Н-тирозина, включившегося в анти-мет-энк-иммунореактивный материал в целом мозгу, без стриатума и мозжечка, выше, чем это обнаруживается в стриатуме. Максимальное мечение (1388 имп./мин) достигается в течение 30 мин после окончания инфузии ^{3}Н-тирозина и остается примерно на том же уровне (1385 имп./мин) в течение двух часов.

Таблица 5

Мечение мет-энкефалина в стриатуме ^{3}Н-глицином или ^{3}Н-тирозином[1]

Время, мин	^{3}Н-мет-энкефалин (имп/мин)	
	^{3}Н-глицин	^{3}Н-тирозин
0	1080	377
15	1301	
30	1278	511

---

[1] В латеральный желудочек мозга крыс инфузировали ^{3}Н-глицин или ^{3}Н-тирозин (150 мкКи), как указано в тексте. Иммунореактивный мет-энкефалин выделяли с помощью аффинной хроматографии на колонке с антисывороткой и определяли его радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Каждая цифра представляет собой средний результат с четырех аффинных колонок.

Обсуждение

Радиоиммунологический тест представляет собой чувствительный и удобный метод для количественного определения мет- и лей-энкефалина, присутствующих в неочищенных экстрактах участков мозга. В изученных нами 34 участках мозга мы обнаружили заметные различия в содержании мет-энкефалина. Наиболее высокая концентрация обнаружена в стриатуме, достигая в бледном шаре 76 пг мет-энкефалина на 1 мг белка (табл. 2). Это распределение хорошо согласуется с данными, полученными при иммуноцитохимических исследованиях [10]. Умеренно высокая концентрация мет-энкефалина в периакведуктальном сером веществе особенно интересна в связи с участием этой области в механизме, контролирующем боль. Вместе с тем высокие концентрации мет-энкефалина обнаружены в стриатуме, и каталепсия, вызываемая всеми агонистами опиатных рецепторов, указывает, видимо, на участие энкефалинов в регуляции экстрапирамидной активности, равно как и болевого порога. Присутствие большого количества энкефалина в аккумбентном ядре, миндалевидном ядре и интерпедункулярном ядре может свидетельствовать об участии энкефалинов в регуляции эмоционального поведения. И наконец, присутствие энкефалина в гипоталамусе явно предполагает нейроэндокринную роль энкефалина. Поскольку было показано, что в различных изученных участках мозга [11] концентрация мет-энкефалина в 5—10 раз выше концентрации лей-энкефалина, мы решили проверить эти данные, определяя содержание мет- и лей-энкефалина после их разделения с помощью ЖХВД. Полученные результаты (табл. 4) подтвердили результаты наших прежних исследований [11].

Хроматография на колонках с аффинной антисывороткой является простым и удобным подходом к выделению радиоактивно меченных энкефалинов из неочищенного экстракта мозга. Полученные экспериментальные данные показывают, что мечение энкефалина свободными радиоактивными аминокислотами возможно. Как видно из табл. 5, после 30 мин инфузии интенсивность включения метки находится на довольно низком уровне и имеет тенденцию к повышению примерно на 30% после окончания инфузии. Сходная кинетика наблюдается в тех случаях, когда мечение проводят путем инфузии глицина с постоянной скоростью. В экспериментах с импульсным внутрижелудочковым введением контрастно меченных аминокислот наблюдается только слабое включение радиоактивности в анти-мет-энк-иммунореактивный материал. Эти результаты соответствуют точке зрения о первичном включении радиоактивности в пул предшественников, который, очевидно, обширнее пула мет-энкефалина. Более того, представляется, что скорости превращения этих предшественников в энкефалин не очень велики. Исходя из сказанного выше, можно предположить, что скорость утилизации энкефалина не очень велика. Содержание мет-энкефалина в стриатуме особенно высоко (табл. 2); данные, приведенные в табл. 5, дают основания предполагать, что пул предшественников в стриатуме должен быть еще больше, чем пул энкефалинов. Эти данные показывают, что примерно за 30 мин после прекращения мечения глицином или тирозином включение радиоактивности в анти-мет-энк-иммунореактивный материал увеличивается примерно на 30%. Предполагая, что равновесное состояние мет-энкефалина и его предшественников не изменяется в период инфузии и что включение ^{3}H-тирозина в предшественники достигает максимума сразу после инфузии, можно оценить, что значение k для выброса ^{3}H-тирозина из пула предшественников не превышает 0,6 ч$^{-1}$. Механизм, участвующий в образовании мет-энкефалина, до сих пор не выяснен. Тщательное изучение компонентов анти-мет-энк-иммунореактивного материала, образующихся через различные интервалы времени после инфузии ^{3}H-аминокислот, и скорости изменения их содержания может облегчить выяснение скоростей и механизма образования энкефалинов.

Список литературы

1. *Bradbury A., Smyth D., Snell C., Birdsall N., Hulma E.* Nature, **260**, 793—795 (1976).
2. *Fratta W., Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Nature, **268**, 452—453 (1977).
3. *Glowinski J., Iversen L. L.*, J. Neurochem., **13**, 655—658 (1966).
4. *Guidotti A., Cheney D. L., Trabucchi M., Doteuchi M., Wang C.* Neuropharmacology, **13**, 1115—1122 (1974).
5. *Guillemin R., Ling N., Burgus R.* C. R. Acad. Sci. (Paris), **282**, 783—785 (1976).
6. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 451—453 (1977).
7. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—579 (1975).
8. *Li C. H., Chung D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1145—1148 (1976).
9. *Ling N., Burgus R., Guillemin R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3942—3946 (1976).
10. *Simantov R., Kuhar M. J., Snyder S. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 2167—2171 (1977).
11. *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ НА ЭНКЕФАЛИНЫ. СОДЕРЖАНИЕ МЕТИОНИН- И ЛЕЙЦИН-ЭНКЕФАЛИНА В МОЗГУ МОРФИНОЗАВИСИМЫХ И ПОВРЕЖДЕННЫХ КАИНОВОЙ КИСЛОТОЙ КРЫС

С. Р. ЧАЙЛДЕРС, Р. ШВАРЦ, Дж. Т. КОЙЛ, С. Х. СНАЙДЕР

(S. R. Childers, R. Schwarcz, J. T. Coyle, S. H. Snyder)

Введение

Энкефалины были впервые идентифицированы Хьюсом [9] в мозгу по морфиноподобной активности в биологическом тесте на vas deferens мыши и подвздошной кишке морских свинок; позднее они были выявлены по конкуренции за связывание с опиатными рецепторами в радиорецепторном тесте [13, 23]. Хотя радиорецепторный тест обеспечивает надежную оценку региональной и субклеточной локализации энкефалинов [16, 18], этот тест не обладает специфичностью, поскольку он выявляет помимо энкефалинов и другие опиоидные пептиды и экзогенные опиатные лекарственные средства. Следовательно, радиорецепторный тест может быть использован только для измерения общей опиоидной активности.

Более высокая специфичность обеспечивается недавно разработанными радиоиммунологическими тестами на метионин-энкефалин (мет-энкефалин) и лейцин-энкефалин (лей-энкефалин) [19, 24]. Использованная в нашей лаборатории высокоспецифическая первичная антисыворотка к лей-энкефалину различает лей-энкефалин и мет-энкефалин, а также энкефалин и β-эндорфин [15]. Антисыворотка к мет-энкефалину, однако, не столь специфична. В этом сообщении мы опишем получение высокоспецифичных радиоиммунологических тест-систем на лей- и мет-энкефалины и использование этих тестов для определения того влияния, которое оказывают избирательные повреждения мозга на содержание энкефалинов и зависимость от морфина.

При исследовании регионального распределения энкефалинов в мозгу [15, 21, 24] выявляется относительно высокое их содержание в полосатом теле (стриатуме), что указывает на существование в этом участке главного энкефалинэргического тракта. Имеет ли этот тракт начало и окончание в стриатуме, можно определить путем специфических повреждений стриатума. Недавно получены данные о том [4, 12], что введение в стриатум каиновой кислоты, аналога глутаминовой кислоты, вызывает избирательную дегенерацию тел нейронов в полосатом теле, но не терминалей, исходящих из участков, расположенных вне полосатого тела. Эти данные можно использовать для выяснения вопроса, существуют ли тела энкефалиновых нейронов в стриатуме. В настоящей работе мы приводим результаты, полученные при изучении влияния повреждений каиновой кислотой и удаления коры мозга на содержание энкефалинов и опиатных рецепторов в стриатуме.

Материал и методы

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТОК К ЭНКЕФАЛИНАМ

Антисыворотка к лей-энкефалину была получена от кроликов после конъюгирования пептида с гемоцианином с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, как описано ранее [15]. Антисыворотку к мет-энкефалину получали после конъюгирования пептида с гемоцианином с помощью глутаральдегида [2]. 5 мг мет-энкефалина (Sandoz, Базель, Швейцария) и 2,5 мг гемоцианина рифового блюдечка (Calbiochem, Сан Диего, Калифорния) растворяли в 330 мкл 0,2 М и Na-ацетатного буфера, pH 5,0, и постепенно добавляли 60 мкл 2,5%-ного (вес/объем) раствора глутаральдегида. Раствор инкубировали в течение 4 ч при 25 °C и центрифугировали 15 мин при 10 000 g. Осадок суспендировали в 1 мл 0,9%-ного NaCl и хранили при —20 °C. Кроликов иммунизировали подкожной инъекцией 200 мкл раствора, конъюгированного с гемоцианином энкефалина, разведенного в 10 раз 0,9%-ным раствором NaCl и смешанного с полным адъювантом Фрейнда. Иммунизацию повторяли через 4 недели, а животных обескровливали двумя неделями позднее.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ

Сыворотку в конечном разведении 1 : 250 или 1 : 500 инкубировали с немеченым энкефалиновым стандартом или с препаратами ткани в течение 3 ч при 0 °C. В каждую пробирку добавляли приблизительно 50 000 имп./мин либо ^{3}H-мет-энкефалина (17,4 Ки/ммоль, New England Nuclear Corp., Бостон, Массачусетс), либо ^{3}H-лей-энкефалина (33,4 Ки/ммоль), доводя конечный объем до 250 мкл. После инкубации при 0 °C в течение ночи в каждую пробирку добавляли в качестве носителя 50 мкл раствора γ-глобулина (5 мг/мл) и связавшуюся радиоактивность осаждали добавлением 1 мл 25%-ного (вес/объем) полиэтиленгликоля 4000. Пробирки центрифугировали 10 мин при 30 000 g, надосадочную фракцию отсасывали, осадки растворяли в 1 мл протосола (New England Nuclear Corp.) и просчитывали с 35%-ной эффективностью в 10 мл сцинтилляционной жидкости LSC (Yorktown Research, Хакенсак, Нью-Джерси).

ИЗУЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Самцов крыс Спрэг-Доули (160 г) под эквитезиновым наркозом (0,6 мл Jensen-Salisbury Lab.) помещали на стереотаксический прибор. Канюлю Гамильтона 30-го калибра вставляли в левый стриатум через высверленное отверстие черепного свода (координаты: 7,9 A; 2,6 L; 4,8 V). Инфузировали 2 мкг каиновой кислоты (Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Миссури) в 2 мкл искусственной СМЖ, pH 7,4. Скальп затем фиксировали швом. Для одностороннего удаления коры мозга снимали черепной свод, покрывающий париетальную и фронтальную кору и отсасывали подлежащую кору до уровня мозолистого тела; кровотечение контролировали с помощью пенистого геля. После фиксации скальпа швом животным для профилактики вводили внутрибрюшинно ампициллин. Через 5 суток после повреждения животных забивали и выделяли полосатое тело, ипсилатеральное к повреждению, контрлатеральное неповрежденное полосатое тело и полосатое тело неоперированных животных. Полосатые тела гомогенизировали в 20 объемах 0,1 н. HCl, определяли содержание энкефалинов с помощью радиоиммунологических тестов, как описано выше, и определяли содержание гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) по методу Грэхэма и Эпризона [6]. Другую группу полосатых тел гомогенизировали в 20 объемах 50 мМ *трис*-буфера, pH 7,7, центрифугировали 10 мин при 48 000 g, ресуспендировали в 400мл 50 мМ *трис*-буфера, pH 7,7 и использовали для определения связывания ^{3}H-налоксона [17] и активности глутаматдекарбоксилазы [14], как описано ранее.

ПОЛУЧЕНИЕ МОРФИНОЗАВИСИМЫХ КРЫС

Крысам-самцам Спрэг-Доули под эфирным наркозом имплантировали подкожно морфиновые пилюли: в первый день крысы получали 75 мг, на третий день — 150 мг, на 6-й день животных забивали. У контрольных крыс проводили ложные операции. Одной группе морфинозависимых крыс за час до забоя инъецировали налоксон (1 мг/кг), чтобы вызвать синдром абстиненции. У всех крыс, получавших налоксон, наблюдали типичные симптомы диарреи и «встряхивания мокрой собаки». Мозг гомогенизировали в 0,1 н. HCl, лиофилизировали, нейтрализовали и вновь лиофизировали. Лиофилизированные образцы вновь растворяли в 1 мл дистиллированной воды и определяли энкефалины с помощью радиоиммунологического теста.

ОТДЕЛЕНИЕ ОПИАТОВ ОТ ЭНДОГЕННЫХ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

Уровни общей эндогенной опиоидной активности измеряли после отделения опиоидных пептидов от введенных опиатных препаратов с помощью хроматографии на дауэксе AG-50. Лиофилизованные экстракты мозга крыс растворяли в 1 мл 50 мМ ацетата аммония, pH 7,4, и наносили на колонку (1×7 см) со смолой даукс AG-50W×8, уравновешенную тем же буфером. Опиоидные пептиды элюировали 20 мл 50 мМ ацетата аммония, pH 10, тогда как морфин и налоксон элюировали 20 мл 1 М NH_4OH (см. «Результаты»). Каждый элюат лиофилизировали, ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и определяли опиоидную активность с помощью радиорецепторного теста, используя вытеснение ^3H-налоксона в препаратах мозга крыс, как описано ранее [15]. Образцы одновременно анализировали в радиоиммунологическом тесте, как описано выше.

Результаты

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНКЕФАЛИНОВЫХ АНТИСЫВОРОТОК

Степень специфичности энкефалиновых антисывороток зависит от реагента, используемого для конъюгации пептида с белком-носителем. Реакция 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК), водорастворимого карбодиимида с лей-энкефалином и гемоцианином приводит к образованию относительно сильного антигена, антисыворотка к которому характеризуется высокими специфичностью и титром (рис. 1). Антисыворотка к лей-энкефалину требует более чем 200-кратного молярного избытка мет-энкефалина по сравнению с лей-энкефалином для получения равного подавления. Связывание ^3H-лей-энкефалина этой сывороткой не подавляется β-эндорфином в концентрации 10^{-5} М. Для получения антисыворотки к мет-энкефалину использование ЭДК для конъюгирования оказывается неэффективным, поскольку ЭДК связывает мет-энкефалин с носителем с низкой эффективностью (приблизительно 5%). Мет-энкефалиновая антисыворотка против ЭДК-антигена как у кроликов, так и у морских свинок обладает низким титром, и, хотя эти антисыворотки эффективно дискриминируют энкефалин и β-эндорфин, они не могут различить мет- и лей-энкефалин.

Конъюгирование мет-энкефалина с гемоцианином с помощью глутаральдегида происходит с эффективностью 55% и приводит к получению более сильного антигена, соответствующего мет-энкефалину. Антисыворотка к этому антигену высокоспецифична, так что для подавления связывания ^3H-мет-энкефалина требуется более чем 200-кратный молярный избыток лей-энкефалина (рис. 1). Антисыворотка к мет-энкефалину не распознает также β-эндорфин в концентрации 10^{-5} М.

Энкефалиновая сыворотка была использована для определения регионального распределения двух энкефалинов в мозгу крыс. Наиболее высокое содержание мет-энкефалина (данные не приве-

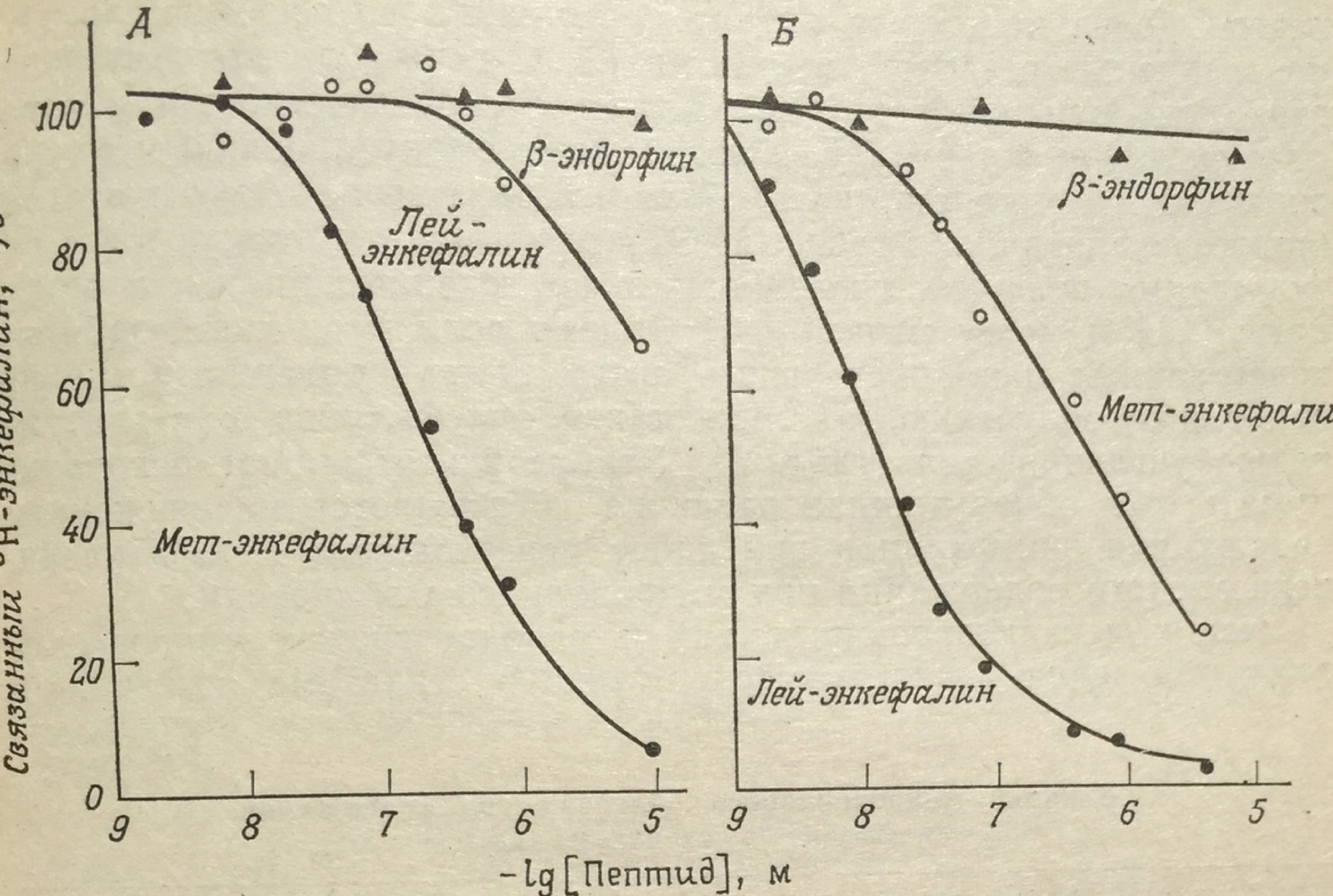


Рис. 1. Специфичность связывания ^{3}H-энкефалина с антисывороткой к энкефалину. Связывание тестировали в присутствии различных концентраций немеченных мет-энкефалина, лей-энкефалина или β-эндорфина (как указано). Антисыворотка к лей-энкефалину была получена против его конъюгата с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом, а антисыворотка к мет-энкефалину была получена против его глутаральдегидного конъюгата, как указано в разд. «Методы». Объем пробы составлял 25 мкл. Данные приведены в процентах от общего связывания в отсутствие немеченых пептидов. *А* — связывание ^{3}H-мет-энкефалина с антисывороткой к мет-энкефалину. *Б* — связывание ^{3}H-лей-энкефалина с антисывороткой к лей-энкефалину.

дены) обнаружилось в полосатом теле (2—3 нмоля/г ткани) и в гипоталамусе (3—4 нмоля/г ткани), а самое низкое — в мозжечке [21, 24]. Отношение мет-энкефалина к лей-энкефалину составляет 8—12, что превышает результаты предыдущих определений [15, 21, 24]. Малое количество энкефалина в гипофизе (менее 5% такового в полосатом теле) представляет, возможно, результат перекрестной реакции антисыворотки с β-эндорфином, содержание которого в этой ткани велико.

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ

Было показано, что метод забоя влияет на содержание некоторых нейромедиаторов и промежуточных продуктов метаболизма в мозгу и что быстрая инактивация протеолитических ферментов путем сфокусированного микроволнового облучения может обеспечить более надежную оценку содержания энкефалинов in vivo по сравнению с забоем декапитацией. Содержание энкефалинов в стриатуме при измерении как радиоиммунологическим, так и радиорецепторным тестом у крыс, забитых сфокусированным микроволновым облучением, оказывается в 2 раза выше, чем у крыс, забитых декапитацией (табл. 1). Эти результаты согласуются с результатами недавних исследований, проведенных на целом мозгу крыс [24] и мозгу мышей [3]. Однако если мозг крыс, забитых перерезанием шеи, подвергнуть затем сфокусированному микроволновому облучению, то содержание энкефалинов в стриатуме также увеличивается (табл. 1). Эти результаты дают основание думать, что обнаруженное различие объясняется не снижением содержания энкефалинов при забое перерезанием шеи, а увеличением этого содержания при микроволновом облучении.

Как у декапитированных, так и у подвергнутых микроволновому облучению животных содержание в стриатуме мет- и лей-энкефалина оказывается примерно таким же, как и уровни общей опиоидной активности, определяемые в радиорецепторном тесте. Это говорит о том, что после экстракции HCl энкефалины являются преобладающими опиоидными пептидами стриатума независимо от посмертных изменений.

Таблица 1

Влияние микроволнового облучения на содержание энкефалина в стриатуме крысы[1]

	Радиоиммунологический тест. Содержание мет- и лей-энкефалинов[2], нмоль/г ткани	Радиорецепторный тест. Содержание эквивалентов мет-энкефалина, нмоль/г ткани
Декапитация	2,09±0,20 (6)	2,27±0,52 (5)
Микроволновое облучение	4,07±0,26 (5)	4,84±0,86 (5)
Микроволновое облучение после декапитации	4,53±0,44 (4)	4,79±0,75 (5)

[1] Каждое определение проводили на стриатуме от четырех крыс. Данные представлены как среднее значение±средняя ошибка. В скобках приведено число измерений.

[2] Содержание лей-энкефалина переводили в эквиваленты мет-энкефалина, принимая, что эффективность мет-энкефалина в радиорецепторном тесте составляет 2,8 таковой для лей-энкефалина.

ВЛИЯНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ И СВЯЗЫВАНИЕ ОПИАТНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ В СТРИАТУМЕ

Для идентификации энкефалинэргических трактов, возникающих и оканчивающихся в стриатуме, проводятся два типа повреждений на мозге крыс. Инъекция в стриатум каиновой кислоты вызывает дегенерацию нейронов, которые являются внутренними для этой области [4, 12], тогда как удаление коры мозга поражает кортикостриарные проекции. Через 5 сут после инъекции каиновой кислоты содержание мет- и лей-энкефалина в стриатуме снижается на 50% (табл. 2). Содержание гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) — маркера внутренних для стриатума ГАМК-эргических нейронов — также снижается на 50%, что соответствует более ранним данным о действии каиновой кислоты [4]. С другой стороны, содержание мет-энкефалина, лей-энкефалина и ГАМК не изменяется при удалении коры мозга (табл. 2). При исследовании обоих повреждений содержание энкефалинов и ГАМК в контрлатеральном стриатуме, в который не производилось инъекций, оказывается таким же, как и в не получавших инъекций контрольных стриатумах.

Больше информации, касающейся энкефалинэргических трактов, можно получить, сравнив влияние повреждения на содержание энкефалинов и на связывание опиатными рецепторами. Стереоспецифическое связывание ^{3}H-налоксона с мембранами стриатума определяли в присутствии 10^{-6} М леваллорфана. Полученные результаты показывают (табл. 3), что инъекция каиновой кислоты снижает связывание ^{3}H-налоксона в стриатуме на 40%, тогда как активность глутаматдекарбоксилазы снижается приблизительно на 70% — в соответствии с полученными ранее результатами [4]. Удаление коры головного мозга также снижает связывание ^{3}H-налоксона на 40%, тогда как активность глутаматдекарбоксилазы лишь слегка снижается. Контрлатеральный стриатум при повреждениях обоих типов обладает таким же уровнем связывания, как и контрольный стриатум.

Таблица 2

Влияние повреждения на содержание энкефалина в стриатуме крысы[1]

Повреждение	Содержание относительно контроля, %		
	мет-энкефалин	лей-энкефалин	ГАМК
Инъекция каиновой кислоты в стриатум (10)	49±12[2]	54±6[3]	49±7[2]
Удаление коры (5)	165±26	105±11	116±9

Содержание в контроле:
мет-энкефалин: 2,67±0,21 нмоль/г ткани
лей-энкефалин: 0,38±0,03 нмоль/г ткани
ГАМК: 2,12±0,06 нмоль/г ткани

---

[1] Стриатум экстрагировали HCl и содержание энкефалинов определяли радиоиммунологическим методом, как описано в разд. «Материал и методы». Данные представлены как среднее значение±средняя ошибка. В скобках показано количество определений.

[2] $p < 0{,}02$.

[3] $p < 0{,}001$.

Таблица 3

Влияние повреждения на стереоспецифическое связывание ^{3}Н-налоксона в стриатуме крысы[1)]

Повреждение	Данные относительно контроля, %	
	Связывание ^{3}Н-налоктона	Декарбоксилаза глутаминовой кислоты
Инъекция каиновой кислоты в стриатум (10)	60±4[2)]	33±6[2)]
Удаление коры (12)	59±3[2)]	89±4[3)]

В контроле:

связывание ^{3}Н-налоксона: 23,5±1,9 фмоль/мг ткани

глутаматдекарбоксилаза: 12,9±0,9 нмоль/(мг/час)

[1)] Стриатум гомогенизировали в 50 мМ *трис*-буфере, pH 7,7, и связывание ^{3}Н-налоксона определяли, как указано в методах. Данные представлены как среднее значение±средняя ошибка. В скобках приведено количество измерений.

[2)] $p<0{,}001$.

[3)] $p<0{,}05$.

Скэтчардовский анализ связывания в стриатуме, в который была инъецирована каиновая кислота, дает линейный график с таким же наклоном, как и при связывании в контрлатеральном стриатуме, но с различными точками пересечения (данные не приведены). Эти результаты показывают, что инъекции каиновой кислоты не влияют на значение K_D у опиатных рецепторов стриатума, но снижают значение $B_{\text{макс}}$ на 28%.

СОДЕРЖАНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ У МОРФИНОЗАВИСИМЫХ КРЫС

В наших предшествующих экспериментах [20] по влиянию морфиновой зависимости на содержание энкефалинов мы определяли эндогенную опиоидную активность с помощью радиорецепторного теста. Развитие радиоиммунологических тестов для энкефалинов дало возможность проводить такое определение энкефалинов, при котором присутствие введенных опиатов не приводит к искажению результатов. После получения морфинозависимых крыс с подкожно имплантированными морфиновыми пилюлями проводили рассечение мозга и определяли содержание энкефалинов в гипоталамусе и стриатуме. Результаты (табл. 4) показывают, что морфиновая зависимость не вызывает изменений в содержании мет- и лей-энкефалина в обоих участках. Индукция синдрома абстиненции при внутрибрюшинной инъекции налоксона также не оказывает существенного действия на содержание мет- и лей-энкефалина в гипоталамусе и стриатуме.

В других экспериментах мы попытались измерить общее содержание эндогенных опиоидов в мозгу морфинозависимых крыс с помощью радиорецепторного теста. Поскольку при использовании этого теста выявляются как опиатные лекарственные препараты, так и эндогенные опиоидные пептиды, решающим этапом является разделение опиатов и опиоидных пептидов. В наших предыдущих исследованиях [20] опиаты и энкефалины разделялись гель-фильтрацией на колонке с биогелем P_2. Однако проведенные позднее эксперименты показали, что в этих условиях может наблюдаться перекрывание пиков энкефалинов и опиатов. В связи с этим мы разработали метод разделения на колонках с использованием дауэкса AG-50, который полностью отделяет опиаты от опиоидных пептидов. Нанесенный на колонку ^{3}H-мет-энкефалин элюируется 50 мМ ацетатом аммония, pH 10, со средним выходом 94%, причем в этих условиях не происходит обнаруживаемой элюции ^{3}H-налоксона (рис. 2). ^{3}H-морфин элюируется 1 М NH_4OH со средним выходом 48%. ^{3}H-лей-энкефалин и ^{125}I-β-эндорфин элюируются в том же положении, что и ^{3}H-мет-энкефалин, тогда как хроматографическое поведение ^{3}H-налоксона соответствует таковому морфина. Более того, опиоидная активность пика pH 10 (или опиоидных пептидов) не увеличивается при добавлении морфина до концентрации 6 нмоль/г к образцам мозга перед разделением на колонке (табл. 5). Следовательно, это разделение может быть использовано для оценки влияния хронического воздействия морфином на содержание опиоидных пептидов в целом мозгу.

Таблица 4

Радиоиммунологический тест на энкефалин в участках мозга морфинозависимых крыс1)

Участок мозга	Воздействие	Содержание энкефалина, пмоль/мг ткани	
		мет-энкефалин	лей-энкефалин
Гипоталамус	Контроль (4)	3510±430	295±38
	Морфинозависимые (4)	4180±260	202±15
	Морфинозависимые+налоксон (4)	4120±290	260±40
Стриатум	Контроль (7)	2200±170	288±40
	Морфинозависимые (6)	2410±280	237±29
	Морфинозависимые+налоксон (5)	3150±410	175±15

1) Данные представлены как среднее значение±средняя ошибка. В скобках приведено количество измерений.

Определение опиоидной активности в целом мозгу с помощью радиорецепторного теста (табл. 5) не выявило влияния хронической обработки морфином на пик pH 10 (опиоидные пептиды).

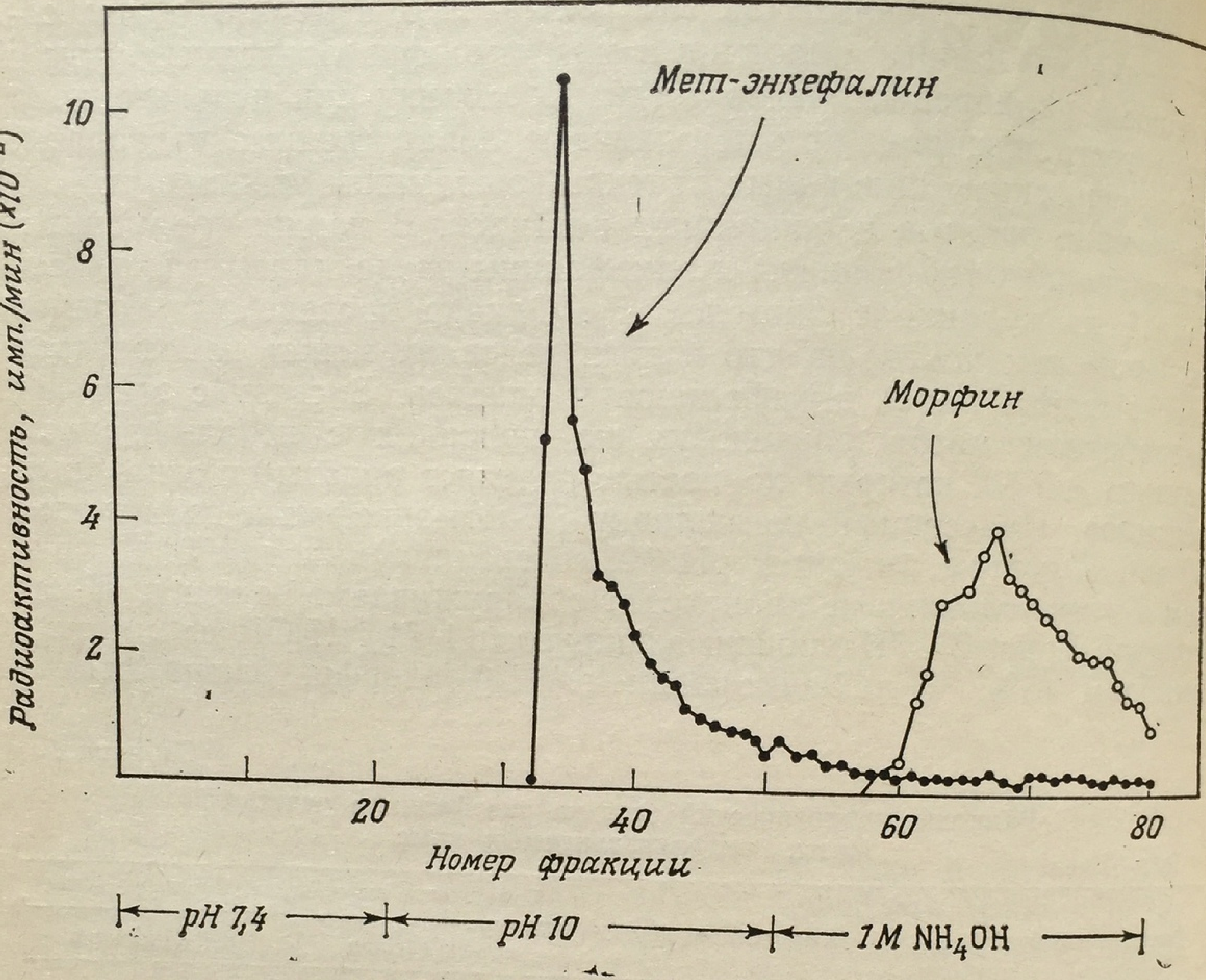


Рис. 2. Ионообменная хроматография ^{3}H-мет-энкефалина и ^{3}H-морфина. Каждый образец наносили независимо на колонку с дауэксом AG-50W. (NH_4^+-форма; 1×20 см), уравновешенную 50 мМ ацетатом аммония, pH 7,4 и элюировали 20 мл того же буферного раствора. После этого колонку элюировали 30 мл 50 мМ ацетатом аммония, pH 10, и затем 30 мл 1 М NH_4OH. Собирали фракции по 1 мл и в пробах по 0,1 мл определяли радиоактивность с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра, ● — ^{3}H-энкефалин; ○ — ^{3}H-морфин.

Более высокая активность в пике, элюируемом 1 М NH_4OH, (опиаты) в мозгу получавших морфин крыс подтверждает присутствие морфина у животных, причем у морфинозависимых крыс, которым вводили налоксон, обнаруживается даже более высокая активность опиатного пика. Анализ пика опиодных пептидов с помощью радиоиммунологического теста приводит к аналогичным результатам, свидетельствующим об отсутствии изменений в содержании мет- и лей-энкефалина у морфинозависимых крыс. Слабое увеличение содержания мет-энкефалина обнаружено у крыс, получавших налоксон. Никаких энкефалинов не обнаруживается при радиоиммунологическом испытании опиатного пика (1 М NH_4OH) у крыс всех групп (данные не приведены). Уровень же эндогенной опиоидной активности, измеряемый радиорецепторным тестом, составляет в опиатном пике контрольных образцов 13—22% опиоидной активности в пике pH 10 (табл. 5).

Таблица 5

Определение эндогенных опиоидов в мозгу морфинозависимых крыс после разделения хроматографией на дауэксе AG-50[1]

	Радиорецепторный тест Содержание мет-энкефалина, пмоль эквивалентов на 1 г ткани		Радиоиммунологический тест Содержание энкефалина, пмоль на 1 г ткани (в пике pH 10)	
Обработка	Пик pH 10 (опиоидные пептиды)	Пик 1 м NH_4OH (опиаты)	Мет-энкефалин	Лей-энкефалин
Контроль (4)	895±189	115±34		
Морфин, добавленный к мозгу in vitro (4)	749±176	1986±90		
Контроль (6)	693±79	151±29	771±50	46±8
морфинозависимые (9)	607±38	1361±149	810±53	50±4
Морфин+морфинозависимые+налоксон (7)	692±72	3044±282	572±32	40±7

[1] Данные представлены как среднее значение±средняя ошибка; числа в скобках обозначают количество измерений.

Обсуждение

Сравнение содержания энкефалинов, выявляемого в радиоиммунологическом тесте, с общей опиоидной активностью, измеренной в радиорецепторном тесте, показывает, что энкефалины являются преобладающими опиоидными пептидами в стриатуме крыс (табл. 1) и в целом мозгу (табл. 5). Хотя применение разных методов экстрагирования может приводить к различным результатам, использованная нами экстракция HCl обеспечивает столь же высокий выход ^{125}I-β-эндорфина, что и энкефалинов. Следовательно, если бы β-эндорфины были бы главными опиоидными пептидами в стриатуме или целом мозгу, они были бы обнаружены в радиорецепторном тесте.

Микроинъекция каиновой кислоты в стриатум приводит к 50%-ному снижению содержания энкефалина в стриатуме, что соответствует результатам Хонга и др. [8]. Удаление коры мозга, однако, не оказывает влияния на содержание энкефалина. Поскольку инъекция в стриатум каиновой кислоты вызывает избирательную дегенерацию нейронов, являющихся внутренними для стриатума, и не влияет на аксоны, исходящие от тел нейронов вне стриатума и проходящие через стриатум или оканчивающиеся в нем [4, 12], то снижение содержания энкефалина под влиянием каиновой кислоты говорит о том, что примерно половина энкефалина в стриатуме связана с нейронами, внутренними для стриатума. Остальные энкефалины локализованы в аксонах нейронов, тела которых расположены вне стриатума. Следовательно, энкефалиновые волокна могут принадлежать как локальным контурам, так и нейронам, образующим длинные тракты. Главный вход нервных волокон в стриатум исходит из коры головного мозга [7]. Хотя эти проекции не затрагиваются при инъекции в стриатум каиновой кислоты, они снижаются при удалении коры мозга. Данные о том, что удаление коры мозга не оказывает влияния на содержание энкефалина в стриатуме, говорят о том, что кора не имеет значительных энкефалинэргических проекций в стриатум.

По тем же самым причинам часть популяции опиатных рецепторов в стриатуме может быть образована нейронами, внутренними для стриатума, поскольку инъекция в стриатум каиновой кислоты снижает связывание ^{3}H-налоксона на 40%. Другая часть популяции опиатных рецепторов расположена, по-видимому, пресинаптически на кортикальных проекциях в стриатум, поскольку удаление коры мозга снижает связывание ^{3}H-налоксона на 40%. Более того, эти пресинаптические опиатные рецепторы расположены не на энкефалиновых волокнах, поскольку такие волокна не приходят из коры. Такой признак пресинаптических опиатных рецепторов соответствует результатам экспериментов Этвеха и Кухара [1], наблюдавшим радиоавтографически потерю опиатных рецепторов в продолговатом мозгу после повреждения вагусного нерва, и результатам Ламотта и др. [11], обнаружившим снижение количества опиатных рецепторов в заднем роге спинного мозга после повреждения дорсальных корешков.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что в некоторых участках центральной нервной системы энкефалиновые терминали образуют аксо-аксонные синапсы, благодаря которым они модулируют высвобождение других медиаторов, включая, возможно, вещество P [10].

При использовании в проведенном исследовании радиоиммунологического теста и улучшенного разделения опиатов для радиорецепторного теста не было обнаружено какого-либо влияния хронического воздействия морфина на содержание мет- или лей-энкефалина или на общую опиоидную активность в гипоталамусе, стриатуме и целом мозгу, независимо от того, вводили ли одновременно с морфином налоксон или нет. Эти результаты согласуются с результатами Фратта и др. [5], которые сообщали об отсутствии влияния морфиновой зависимости на определяемое радиоиммунологически содержание энкефалина. Различия между полученными сейчас и ранее результатами могут проистекать из перекрывания морфиновой и энкефалиновой фракций в элюате с колонки с биогелем P_2 в проводившихся ранее исследованиях. Этим можно объяснить кажущееся увеличение содержания энкефалинов после воздействия морфином. С другой стороны, Розье, Гуиллемин и Блюм (личное сообщение) наблюдали 40—50%-ное увеличение содержания иммунореактивных энкефалинов в стриатуме и продолговатом мозгу — мосту, но не в гипоталамусе крыс, получавших хронически внутрибрюшинные инъекции морфина. На основании этих исследований нельзя с уверенностью сделать вывод о связи морфиновой зависимости с изменением обмена энкефалинов.

* *
*

Мы благодарим Адель Сноуман и Роберта Зачека за высококвалифицированную техническую помощь.

1. *Atweh S., Kuhar M. J.* Neuropharmacology (1977). In press.
2. *Avrameras S., Laudou B., Chuilon S.* Immunochemistry, **6**, 67—76 (1969).
3. *Cheung A. L., Stavinoha W. B., Goldstein A.* Life Sci., **20**, 1285—1290 (1977).
4. *Coyle J. T., Schwarcz R.* Nature, **263**, 244—245 (1976).
5. *Fratta W., Yang H.-Y. T., Hong J., Costa E.* Nature, **268**, 452—453 (1977).
6. *Graham L. T., Aprison M. H.* Anal. Biochem., **15**, 487—497 (1966).
7. *Hedreen J. C.* Neurosci. Letts., **4**, 1—8 (1977).
8. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Hong J., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 451—453 (1977).
9. *Hughes J. T.* Brain Res., 88, 295—308 (1975).
10. *Jessell T. M., Iversen L. L.* Nature (1977). In press.
11. *LaMotte C., Pert C. B., Snyder S. H.* Brain Res., **112**, 407—412 (1976).
12. *McGreeer E. G., McGreer P. L.* Nature, **263**, 517—518 (1976).
13. *Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).
14. *Schwarcz R., Coyle J. T.* Brain Res., **127**, 235—249 (1977).
15. *Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H.* Brain Res. (1977).
15. *Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H.* Brain Res. (1977). In press.
16. *Simantov R., Kuhar M. J., Pasternak G. W., Snyder S. H.* Brain Res., **106**, 189—197 (1976).
17. *Simantov R., Snowman A. M., Snyder S. H.* Mol. Pharmacol., **12**, 977—986 (1976).
18. *Simantov R., Snowman A. M., Snyder S. H.* Brain Res., **197**, 650—657 (1976).
19. *Simantov R., Snyder S. H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 41—48, North-Holland, Amsterdam (1976).
20. *Simantov R., Snyder S. H.* Nature, **262**, 505—507 (1976).
21. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, North-Holland, Amsterdam (1976).
22. *Snyder S. H.* Scientific Amer., **236**, 44—56 (1977).
23. *Terenius L., Wahlstrom A.* Life Sci., **16**, 1759—1764 (1975).
24. *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).

НЕКОТОРЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ЭНДОРФИНАМИ И ГОРМОНАМИ ГИПОФИЗА

А. САНТАГОСТИНО, Д. КОЧЧИ, Г. ДЖИАНЬОНИ, Е. ГОРИ
Е. МЮЛЛЕР, С. ФЕРРИ

(A. Santagostino, D. Cocchi, G. Giagnoni, E. Gori,
E. Müller, S. Ferri)

Два имитирующих морфин пентапептида, мет-энкефалин и лей-энкефалин, были обнаружены и выделены из экстрактов мозга различных видов [8]. Другое семейство пептидов с опиатоподобной активностью, таких, как α-эндорфин (β-липотропин$_{61-76}$), β-эндорфин (β-липотропин$_{61-91}$) и γ-эндорфин (β-липотропин$_{61-77}$) также было выделено из экстрактов гипофиза и охарактеризовано [1, 3, 7]. Эти пептиды помимо обращения индуцированной налоксоном анальгезии обладают также и многими другими биохимическими эффектами наркотиков.

В предшествующей работе [2] мы показали, что лей-энкефалин при введении в желудочек мозга неполовозрелых крыс стимулирует зависимое от дозы высвобождение гормона роста и пролактина; идентичным действием обладает морфин. Предварительное введение налоксона подавляет высовобождение гормона роста, вызываемое как лей-энкефалином, так и морфином. Однако индуцированное лей-энкефалином высвобождение пролактина в отличие от эффекта морфина не подавляется в сколько-нибудь значительной степени налоксоном.

В соответствии с полученными нами результатами Ривьер и др. [10] сообщили о высвобождении пролактина in vivo под действием мет-энкефалина, а также β-эндорфина. Поскольку эти авторы обнаружили, что в экспериментах in vitro оба лекарственных препарата неэффективны, они высказали предположение об участии в проявлении эффекта каких-то отделов центральной нервной системы. Исходя из имеющихся данных, можно себе представить, что эти опиоиды могут функционировать в качестве эндогенных систем в изменении событий, индуцированных либо физиологическими факторами, либо под влиянием окружающей среды. В подтверждение этой гипотезы мы приведем ниже данные о том, что стресс вызывает значительное накопление опиоидных факторов в гипофизе крыс.

Мы использовали крыс-самок Спрэг-Доули весом 230±20 г. Чтобы свести к минимуму фоновые вариации (т. е. вариации, воз-

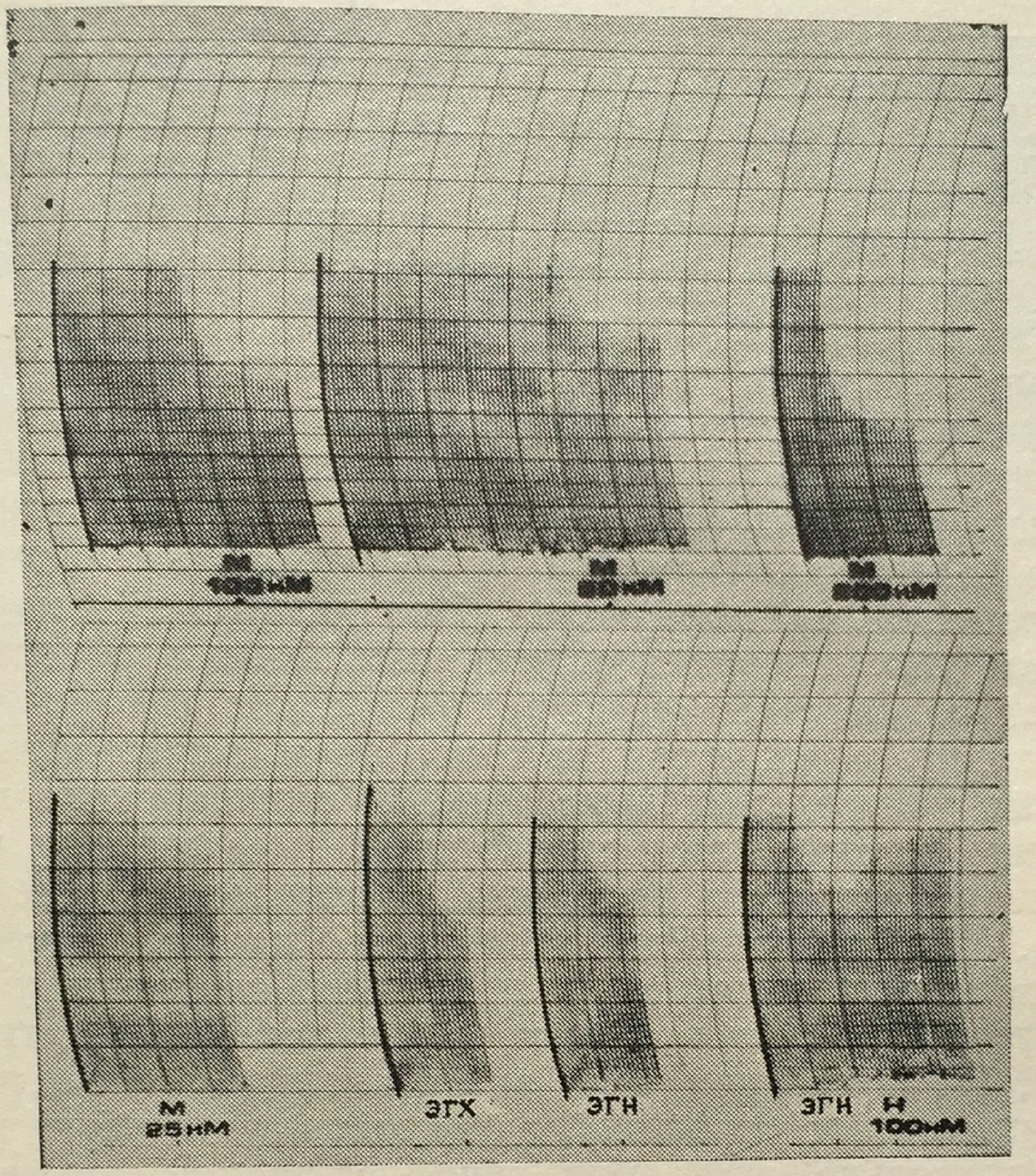


Рис. 1. Влияние экстракта гипофиза крысы на препараты ауэрбахова сплетения продольных мышц морской свинки.

Подвздошную кишку устанавливали в камере с 7,5 мл бикарбонатного раствора Рингера, уравновешенного 95% O_2 и 5% CO_4, и подвергали электростимуляции (80 В, 0,2 Гц, продолжительность 1 мс). Детали опыта описаны в другой статье [4]. М — морфин, Н — налоксон, ЭГН — экстракт гипофиза нормальных крыс (контроль), ЭГХ — экстракт гипофиза крыс после холодовой обработки.

никающие под влиянием каких-то условий, отличных от исследуемых), крыс содержали в изолированном помещении с воздушным кондиционированием (22±2 °С) с 17 ч до времени проведения эксперимента между 9 и 12 ч следующего дня. До начала эксперимента животные получали пищу и воду ad libitum. В каждом эксперименте крыс разделяли на две группы по 10 животных в каждой. Контрольную группу содержали при комнатной температуре, а крыс второй группы помещали на 2 ч в термостатированное помещение при 4 °С. Эксперимент повторяли 6 раз.

Всех животных быстро декапитировали, извлекали гипофиз, который хранили при —20 °С. Для определения опиатной активности собранные железы каждой группы гомогенизировали в ацетоне; сухой порошкообразный материал получали и частично очищали по методу, описанному Тесчемахером и др. [11]. Для сравнения опиатной активности конечные фракции порошка растворяли в дистиллированной воде (0,2 мл на 100 мг исходного сырого веса ткани). Два раствора доводили затем до pH 7,4, центрифугировали при 0 °С при 12 000 g, и 0,1 мл просветленной надосадочной фракции исследовали на чувствительной к морфину модели: продольное сокращение межмышечного сплетения подвздошной кишки морской свинки [4].

Опиатную активность измеряли, используя подвздошную кишку морской свинки, и выражали в нмолях морфиновых эквивалентов. Как показано на рис. 1, экстракты гипофизов обеих групп крыс вызывают подавление электрически вызванных сокращений препаратов подвздошной кишки морской свинки, аналогично действию, оказываемому морфином. Использование морфиновых эквивалентов для измерения содержания опиатов в гипофизе оправдывается подавлением действия экстрактов гипофиза на подвздошную кишку морских свинок налоксоном. Активность экстрактов гипофиза контрольных крыс (рис. 2) эквивалентна дозе морфина 4,96 нмоль, тогда как в случае крыс, выдержанных в течение 2 ч на холоду, активность экстрактов эквивалентна дозе морфина 6,85 нмоль. Морфиноподобная активность гипофиза крыс, выдержанных на холоду, превышает, следовательно, таковую у контрольных крыс примерно в 4 раза, и это различие статистически достоверно. На основании этих экспериментов можно предположить, что увеличение опиоидной активности в мозжечке крыс при стрессе параллельно активации гипофизо-надпочечниковой оси.

Чтобы проверить это предположение, мы измеряли опиатную активность в гипофизе крыс, получавших кортикостероиды. Животных произвольно разделяли на три группы по 10 крыс в каждой; условия окружающей среды были стандартизованы, как описано ранее. Крысы первой группы получали внутрибрюшинно рас-

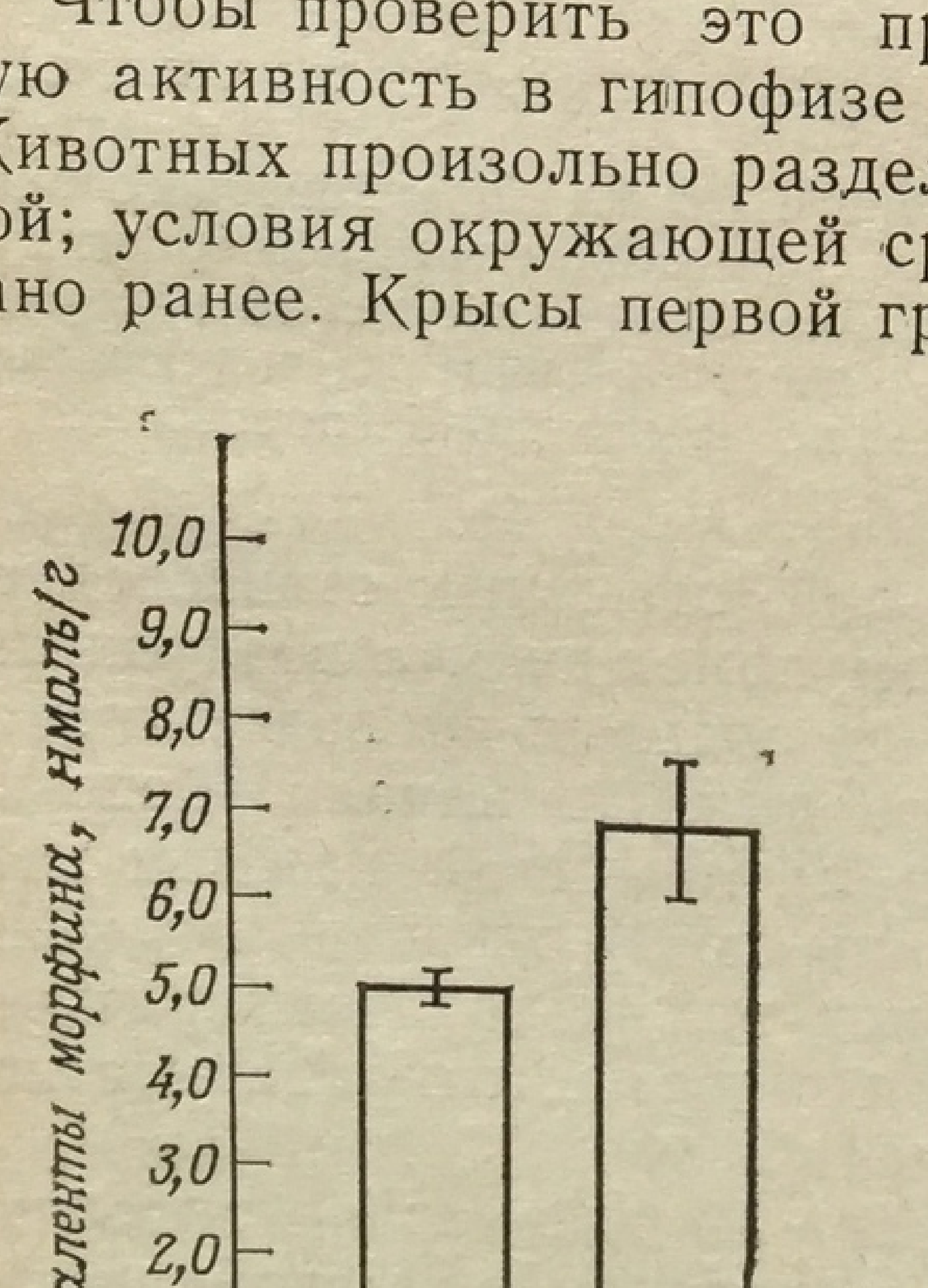


Рис. 2. Опиоидная активность (см. текст) гипофизов, полученных от нормальных крыс (НК) и от крыс, подвергнутых холодовой обработке (КХ). Каждый столбик обозначает среднее значение для 6 экспериментов ± средняя ошибка. $p<0,05$ при сравнении с использованием t-теста. Число животных, использованных в эксперименте, равно 20.

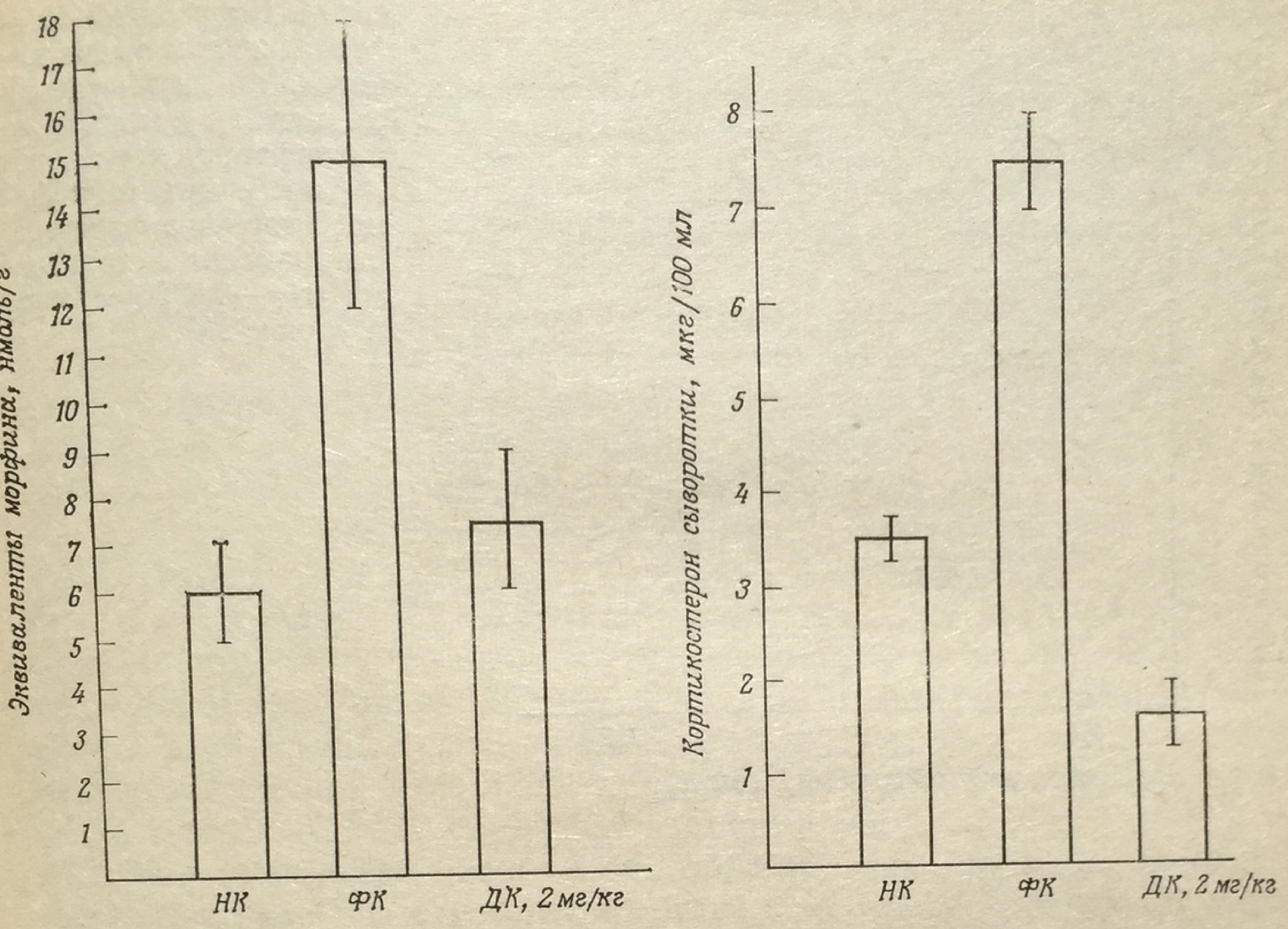


Рис. 3. Опиоидная активность в гипофизе и концентрация кортикостерона в сыворотке крыс, получавших дексаметазон. Каждый столбик обозначает среднее значение для 5 экспериментов ± средняя ошибка. Значения, полученные для крыс, которым вводили дексаметазон, достоверно отличаются от значений, полученных для крыс, которым вводили физиологический раствор. НК — необработанные крысы; ФК — крысы, получавшие физиологический раствор; ДК — крысы, получавшие дексаметазон.

творенный в физиологическом растворе дексаметазонвалерат (2 мг/кг), крысы второй группы получали тот же объем просто физиологического раствора, а крысы третьей группы не подвергались никакому воздействию.

Через два часа всех крыс быстро декаптировали и у них извлекали гипофиз для определения опиатной активности в соответствии с методом, описанным выше. Кровь всех животных из каждой группы собирали, объединяли и определяли содержание кортикостерона по Гуиллемину и др. [6].

Как показано на рис. 3, экстракты от обработанных физиологическим раствором крыс проявляли опиатную активность, эквивалентную дозе 14,90 нмоль морфина в расчете на 1 г сырой ткани гипофиза. Это значение в два раза выше, чем таковое для гипофиза животных третьей группы. Можно заключить, следовательно, что стресса, связанного с инъекцией и тем, что животное берут в руки, оказывается достаточно для увеличения содержания опиоидов в гипофизе крыс. Это увеличение блокируется введением декса-

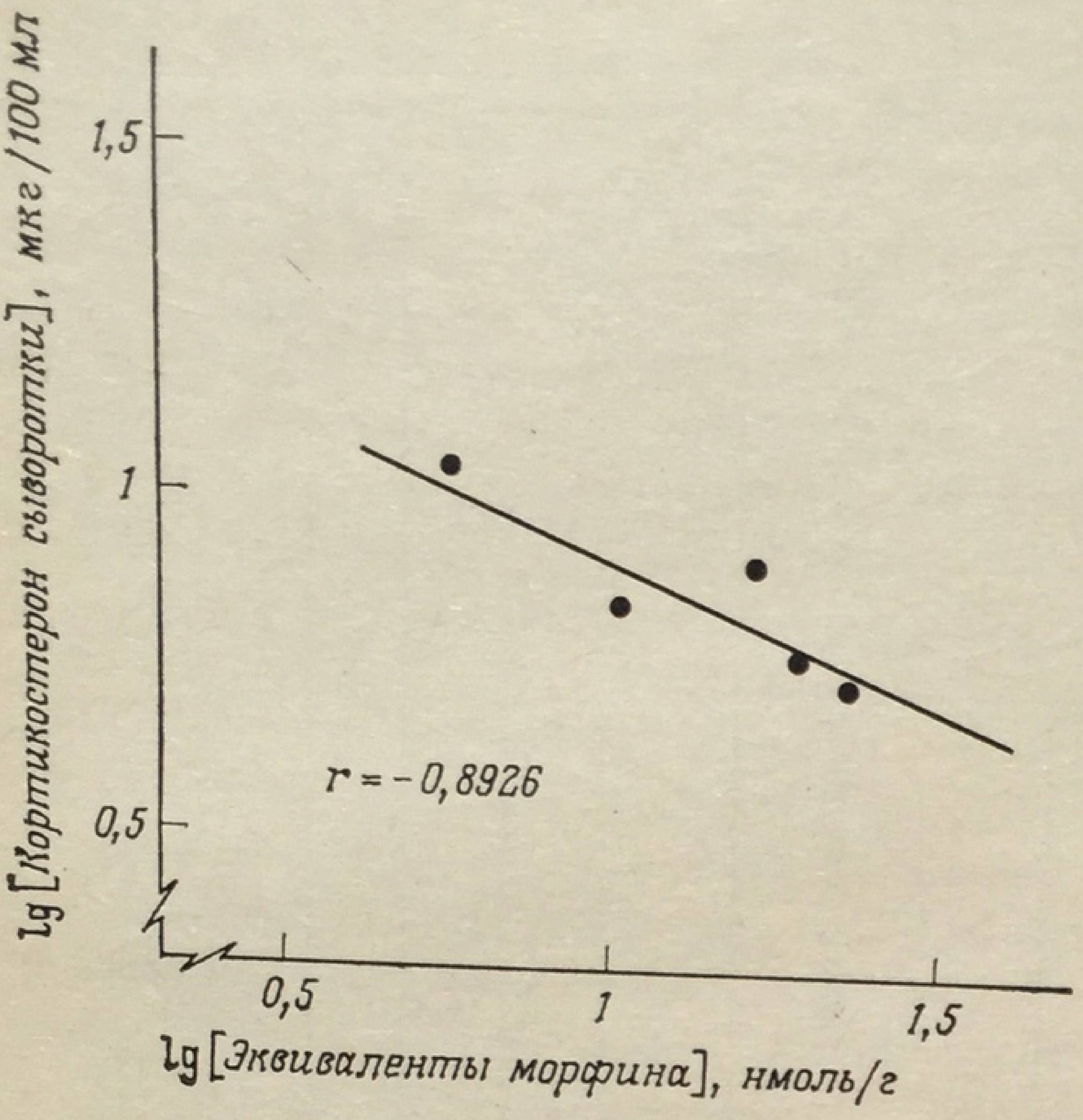


Рис. 4. Корреляция между содержанием кортикостерона в сыворотке и опиоидной активностью в гипофизе у крыс через 2 ч после инъекции физиологического раствора. Коэффициент корреляции (r=—0,8926) значим на уровне 1%.

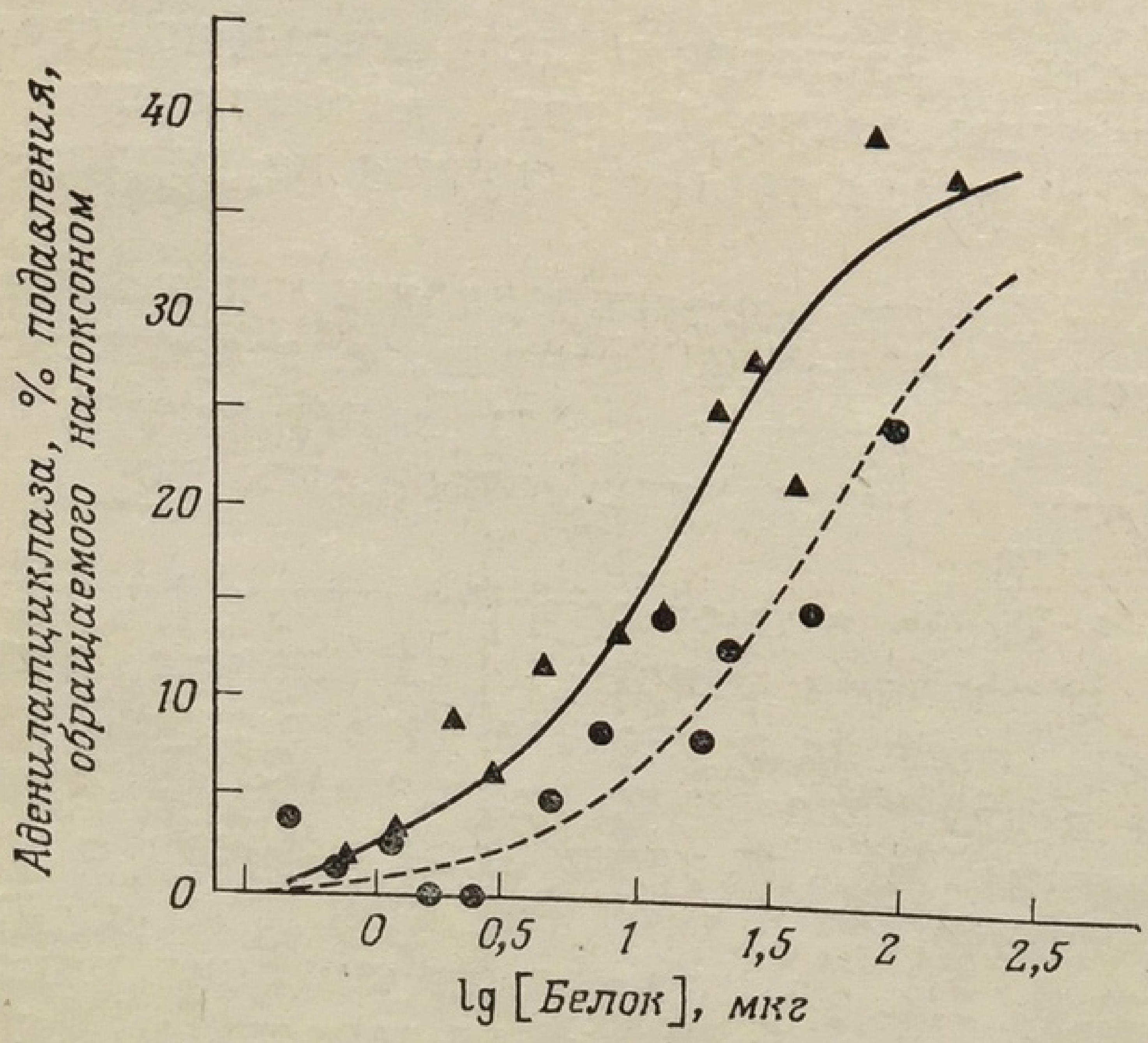


Рис. 5. Обращаемое налоксоном подавление активности аденилатциклазы в гомогенате гибридных клеток NG 108-15 при добавлении экстракта клеток AtT 20. Более подробно см. [5]. Клетки AtT 20 росли в течение 8 дней в присутствии или в отсутствие дексаметазонфосфата (1 мкг/мл), разведенного в 0,17 М NaOH. В течение всего периода роста среду меняли 3 раза и рост культуры оценивали путем подсчета клеток. ▲ — контроль, ● — дексаметазон.

метазона (статистически значимо по результата дисперсионного анализа на испытываемой группе в целом). Дексаметазон вызывает также снижение содержания кортикостерона. Эти результаты подтверждают гипотезу, согласно которой у крыс существует тесное соответствие между функционированием гипофизо-надпочечниковой оси и опиоидной активностью в экстракте гипофиза. В связи с этим мы продемонстрировали также линейную обратную корреляцию ($r=0{,}89$) между содержанием кортикостерона в сыворотке и опиоидной активностью в экстрактах гипофиза у получавших физиологический раствор крыс (рис. 4). Дальнейшее подтверждение нашей гипотезы мы обнаружили в некоторых экспериментах, проведенных недавно Джианьони и др. [5].

В этой работе было показано, что секретирующая АКТГ аденокарцинома передней доли гипофиза крыс (AtT 20) синтезирует in vitro эндорфин [5]. Прокипяченный экстракт этой опухоли способен блокировать активность аденилатциклазы в гибридных клетках нейробластомы и глиомы (NG108-15). Часть этого ингибирования аденилатциклазы, обращаемая налоксоном, отражает опиатную активность экстракта гипофиза. На рис. 5 опиатную активность клеток AtT 20, растущих в присутствии или в отсутствие налоксона, оценивали, исходя из обращаемого налоксоном подавления активности аденилатциклазы в клетках NG 108-15. Когда клетки AtT 20 росли в течение восьми дней в присутствии дексаметазона (1 мкг/мл), кривая смещалась вправо, указывая таким образом, что кортикостероиды непосредственно вызывают снижение содержания эндорфина в секретирующих АКТГ клетках AtT 20.

Таким образом, результаты этих исследований позволяют предположить, что в клетках гипофиза процессы синтеза эндогенных опиоидов и АКТГ могут быть сопряжены. Хорошо известно, что β-липотропин гипофиза содержит не только последовательности различных эндорфинов, но и фрагмент АКТГ от Met^{4} до Gly^{10}. Хотя синтез АКТГ непосредственно из β-липотропина невозможен, эндорфины и АКТГ могут действовать координированно как гомеостатическая система в связи с поведенческим ответом на стрессовые условия.

Список литературы

1. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Birdsall N. J. M., Hulme C. E.* Nature, **260**, 793—795 (1976).
2. *Cocci D., Santagostino A., Gil-Ad I., Ferri S., Muller E.* Life Sci. (1977). In press.
3. *Cox B. M., Goldstein A., Li C. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1821—1825 (1976).
4. *Ferri S., Reina R., Santagostino A.* Br. J. Pharmacol., **59**, 25—28 (1977).
5. *Giagnoni G., Sabol S. L., Nirenberg M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 2259—2263 (1977).

6. *Guillemin R., Clayton G. W., Lipscomb H. S., Smith J. D.* J. Lab. Clin. Med., **53**, 830—837 (1959).
7. *Guillemin R., Ling N., Burgus R.* C. R. Acad. Sci. Ser. D, **282**, 783—785 (1976).
8. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Forthergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, 258, 577—579 (1975).
9. *Li C. H., Chung D.* Nature, **260**, 622—624 (1976).
10. *Rivier C., Vale W., Ling N., Brown M., Guillemin R.* Endocrinology, **100**, 238—241 (1977).
11. *Techemacher L., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A.* Life Sciences, **16**, 1771—1776 (1975).

ДАЛЬНЕЙШЕЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРИРОДЫ И ФУНКЦИИ ГИПОФИЗАРНЫХ ЭНДОРФИНОВ

Б. М. КОКС, Е. Р. БЕЙЗМАН, ТСУН-ПИНГ СУ,
О. Г. ОСМАН, А. ГОЛДСТАЙН

(B. M. Cox, E. R. Baizman, Tsung-ping Su,
O. H. Osman, A. Goldstein)

Поиски эндогенного лиганда (лигандов) для опиатных рецепторов были стимулированы данными о существовании специфических, весьма высокоаффинных участков связывания для опиоидных препаратов — участков, которые, казалось, не выполняли никаких функций, за исключением нефизиологической ситуации, возникающей при введении чужеродных опиоидных алкалоидов. Успех этих исследований в области идентификации эндогенных лигандов опиатных рецепторов (эндорфинов) [11, 13, 18, 19] оставил много неразрешенных вопросов, касающихся физиологической роли этой системы. Эндорфины обнаружены во многих участках нервной ткани, но в наиболее высокой концентрации они присутствуют в гипофизе. В настоящей статье мы опишем некоторые эксперименты, направленные на выяснение возможных функций гипофизарных эндорфинов.

Эндорфины в гипофизе

Впервые наличие в гипофизе эндорфинов было продемонстрировано в опытах с экстрактами гипофиза свиней и крупного рогатого скота [4, 19]. Эти виды животных неудобны для экспериментальных исследований, в связи с чем мы разработали методы измерения содержания эндорфинов в отдельных долях индивидуального гипофиза крысы.

Гипофиз крысы быстро извлекали из черепа животных, убитых декапитацией, помещали в охлажденный до температуры таяния льда физиологический раствор и разделяли переднюю и нейроинтермедиальную доли. В некоторых экспериментах проводили раздельное выделение pars intermedia и pars nervosa под стереомикроскопом. Высушенные фильтровальной бумагой доли гипофиза немедленно взвешивали и экстрагировали ледяной уксусной кислотой с ацетоном, используя модификацию метода экстракции, описанного Тесчемахером и др. [19]. Низкий уровень активности

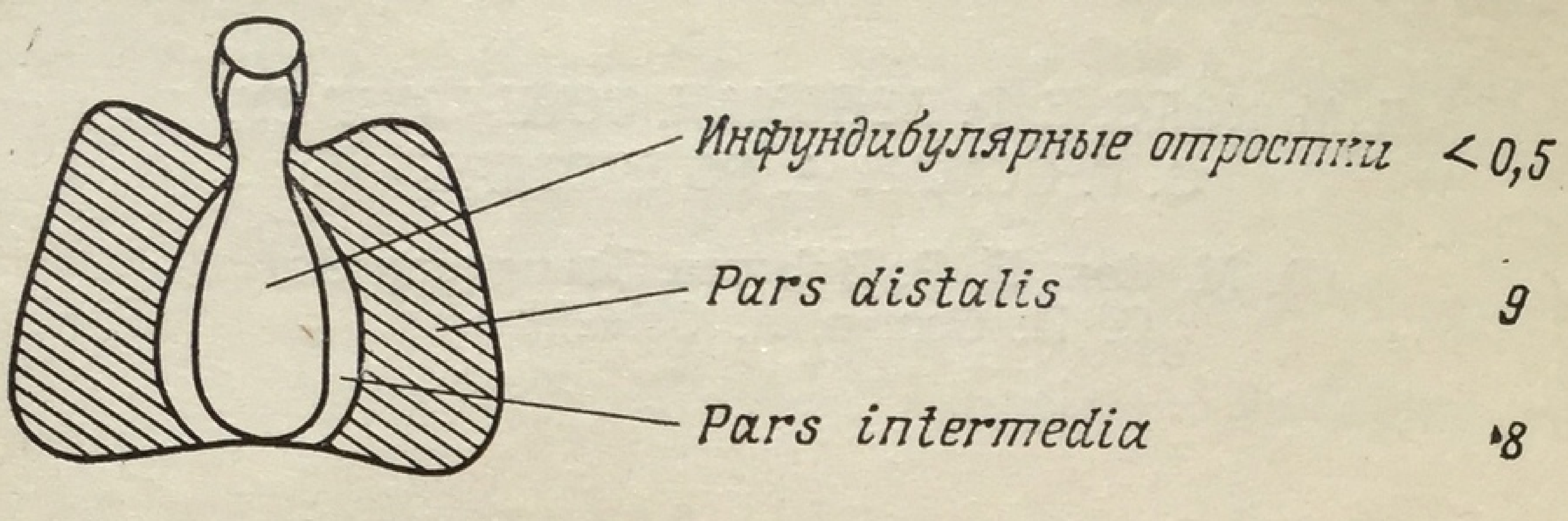


Рис. 1. Распределение эндорфина в гипофизе крысы. На рисунке представлен вид железы с дорсальной стороны. Цифры обозначают количество единиц эндорфина (ID_{50}; см. текст), содержащееся в каждой части железы (значения средние, полученные на 16 крысах-самцах Спрэг-Доули весом 300 г).

в отдельных долях гипофиза крысы исключал возможность использования изолированного препарата подвздошной кишки морской свинки в качестве обычной тест-системы, хотя объединенные экстракты нескольких гипофизов крыс вызывали обращаемое налоксоном торможение в этой системе [15]. В экспериментах с индивидуальными гипофизами в качестве меры опиоидной активности использовали подавление стереоспецифического связывания ^3H-эторфина с мембранами мозга крыс. Каждый экстракт исследовали при трех различных концентрациях (по три пробы на точку) и значение ID_{50} (количество экстракта, вызывающее 50%-ное ингибирование стереоспецифического связывания ^3H-эторфина) определяли по вычисленной линии наилучшего соответствия. Содержание эндорфина в железе вычисляли как количество единиц ID_{50} в полном экстракте. В условиях нашего эксперимента одна единица ID_{50} соответствовала примерно 20—25 пмоль β-эндорфина.

Распределение активности эндорфина у типичного взрослого самца крыс Спрэг-Доули представлено на рис. 1. Примерно равное количество эндорфина обнаруживается в pars distalis и pars intermedia, но поскольку вес pars intermedia значительно ниже, чем вес pars distalis, то концентрация эндорфинов в pars intermedia оказывается в 6—9 раз выше. Незначительные количества эндорфина обнаруживаются в pars nervosa, причем эти следовые количества активности могут быть обусловлены загрязнением ткани фрагментами pars intermedia. Это распределение эндорфинов у крыс соответствует другим данным о распределении эндорфинов в гипофизе крупного рогатого скота [15], а также распределению β-эндорфина в гипофизе крысы, выявляемому иммуноцитофлуоресцентным методом [1]. При определении молекулярного веса опиоидного материала в гипофизе крыс получена величина, близкая к молекулярному весу β-эндорфина [15]. Анализ экстрактов гипофизов, полученных как с помощью ледяной уксусной кислоты, так и с помощью водных буферных растворов, не выявил наличия мелких эндорфинов, таких, как энкефалины [15]. Кроме того, в наших экстрактах было мало активного материала, кажущийся молекулярный вес которого соответствовал бы молекулярному весу α-эндорфина. Мы пришли к выводу, что бóльшая часть опиоидной активности в гипофизе обусловлена β-эндорфином, что отнюдь не исключает возможности наличия в гипофизе других родственных опиоидных пептидов.

Факторы, влияющие на содержание эндорфинов в гипофизе

Обнаружены существенные изменения в содержании эндофрина в обеих долях гипофиза крысы в прооцессе развития; содержание эндорфина в гипофизе существенно увеличивается ко времени наступления половой зрелости (Бейзман и Кокс, в печати). Сходное увеличение содержания в гипофизе меланоцитстимулирующего гормона, как сообщалось ранее, происходит примерно на пятой неделе после рождения [10]. В связи с этим существенно, чтобы опыты, в которых исследуется влияние различных воздействий на содержание эндорфина в гипофизе, проводились бы на крысах сходного веса и возраста. Во всех случаях, кроме специально оговоренных, эксперименты, описанные ниже, проводились на взрослых самцах крыс весом 300—350 г.

Эндорфин контролируется в pars intermedia. Механизм, контролирующий секрецию в pars intermedia, все еще остается неясным. У крыс эта ткань очень бедна сосудами [7] — в отличие от pars distalis; можно думать в связи с этим, что либерины, переносящиеся от гипоталамуса портальной сосудистой системой, имеют меньшее значение для регуляции секреции в pars intermedia по сравнению с таковой в pars distalis. При этом в pars intermedia обнаруживаются обильная иннервация [7] и наличие многих предполагаемых нейромедиаторов [3, 16]. У человека, однако, нет обособленной pars intermedia, а клетки интермедиального типа рассеяны по pars distalis [6, 14]. Не получено пока еще никаких данных о том, что иннервация этих рассеянных клеток сходна с той, которая наблюдается у низших млекопитающих. Было высказано предположение о том, что β-эндорфин и β-меланоцитстимулирующий гормон (β-МСГ) образуются из пептида-предшественника, β-липотропина (β-ЛПГ) [2]. Недавно были получены данные о том, что адренокортикотропин (содержащий последовательность α-МСГ) и β-ЛПГ сами образуются из общего пептида-предшественника с мол. массой 31 000 дальтон [12]. Процесс регуляции хранения и выброса пептидов, происходящих из общего предшественника, но обладающих при этом различной биологической активностью, представляет значительный интерес. Ниже мы суммируем результаты экспериментов, в которых мы изучали изменение содержания эндорфинов в гипофизе при воздействиях, которые, как известно, изменяют содержание МСГ в гипофизе.

У крыс pars intermedia иннервируется от паравентрикулярного ядра (ПВЯ), и билатеральное повреждение этого ядра приводит к увеличению содержания МСГ в нейромедиальной доле, обнаруживаемому как по биологической активности [9], так и радиоиммунологическим методом [20]. Увеличение содержания МСГ в железе сопровождается увеличением количества циркулирующего МСГ [20]. В наших опытах билатеральное, гистологически подтвержденное повреждение ПВЯ не влияло на содержание эндорфина ни в нейроинтермедиальной, ни в передней долях гипофиза у крыс (табл. 1). ПВЯ может быть стимулировано сосанием груди; эта стимуляция снижает содержание МСГ в гипофизе [17]. Однако у наших крыс, которые после родов лактировали в течение менее чем двадцати четырех часов или в течение недели, содержание эндорфинов в гипофизе остается в нормальных пределах (табл. 1). Замена питьевой воды гипертоническим раствором хлористого натрия вызывает увеличение содержания МСГ в нейроинтермедиальной доле [8]. В наших экспериментах введение 2%-ного раствора хлористого натрия в течение периода от 12 ч до одной недели приводит к существенному снижению содержания эндорфина как в передней, так и в нейроинтермедиальной долях гипофиза у 50% крыс. У остальных подвергавшихся такому же воздействию крыс содержание эндорфина остается в пределах нормы (табл. 1). Эти результаты, как нам кажется, указывают на то, что механизмы, обеспечивающие процессинг, запасание и (или) выделение в гипофизе МСГ и эндорфинов, не идентичны, хотя эти

Таблица 1

Влияние экспериментальных воздействий на содержание МСГ и эндорфина в гипофизе1)

Экспериментальное воздействие	Изменение в содержании МСГ		Изменение в содержании эндорфина2)	
	Н. И. Д.	П. Д.	Н. И. Д.	П. Д.
Билатеральное повреждение паравентрикулярного ядра	↑3)	—	0	0
Вскармливание детеныша	↓4)	↓4)	0	0
Воздействие гипертоническим солевым раствором	↑5)	—	↓6)	↓6)

1) Н.И.Д. — нейроинтермедиальная доля; П.Д. — передняя доля; ↑ — достоверное увеличение содержания в гипофизе ($p<0,05$); ↓ — достоверное снижение содержания в гипофизе ($p<0,05$); 0 — отсутствие достоверных изменений содержания в гипофизе ($p>0,05$); прочерк (—) — не изучалось.

2) Неопубликованные данные.

3) Данные взяты из работ [9, 20].

4) В этих экспериментах нейроинтермедиальная и передняя доли не разделялись [17].

5) Данные взяты из работы [8].

6) Этот эффект наблюдали у 50% обработанных животных.

соединения и имеют общее происхождение. Несомненно, тот факт, что пептиды с различной биологической активностью могут находиться под дифференцированным контролем, дает животному определенное преимущество.

Функции тех или иных гормонов часто могут нарушаться при введении больших доз экзогенных веществ, действующих на рецепторы этих гормонов. В связи с этим мы изучали действие хронического введения опиоидных препаратов на содержание эндорфинов в гипофизе крыс. У части хронически морфинизированных крыс симптомы опиатной абстиненции вызывались введением налоксона. Крысы других групп получали однократные высокие дозы морфия или налоксона (табл. 2). Ни одно из этих воздействий не вызывало достоверного изменения содержания эндорфина в гипофизе. Введение налоксона хронически морфинизированным крысам вызывало типичные симптомы опиатной абстиненции. Можно было ожидать выброса эндорфинов в ответ на сниженный уровень активации опиатных рецепторов относительно такового при толерантности. Однако слабое снижение содержания эндорфинов в гипофизе, наблюдаемое в это время, было статистически недостоверным. Возможно, что увеличение выброса гипофизарного эндорфина все же происходит при опиатной абстиненции, но это компенсируется увеличением образования эндорфина в самой железе. В связи с этим интересно отметить, что достоверное снижение содержания эндорфина в гипофизе может наблюдаться после применения стрессорных стимулов, таких, как электрошок или физическое ограничение (Бейзман и др., в печати).

Таблица 2

Влияние введения опиатов на содержание эндорфина в гипофизе

Воздействие	Содержание эндорфина, единицы ID_{50} на одну железу	
	передняя доля	нейроинтермедиальная доля
Контроль	12,8±2,3 (5)	5,3±1,5 (5)
Морфин, 10 мг/кг, 1 ч	10,9±1,6 (6)	6,8±2,1 (6)
Налоксон, 1 мг/кг, 30 мин	10,3±2,5 (6)	4,3±0,6 (6)
Морфин, хронически, 3 сут[1]	2±1,5 (6)	4,3±0,8 (6)
Морфин, хронически, 3 сут+налоксон, 30 мин	9,7±1,2 (6)	3,6±0,5 (6)
Таблетки плацебо, 3 сут[2]	13,0±1,6 (5)	7,4±2,0 (4)

[1] За три дня до начала эксперимента крысам имплантировали подкожно под легким эфирным наркозом 5 морфиновых таблеток, содержащих 75 мг морфина, считая его количество по основанию.

[2] Таблетки плацебо не содержали морфина. Во всех остальных аспектах контрольные крысы подвергались тем же воздействиям, что и хронически морфинизированные крысы. Подбор крыс для различных экспериментальных групп был случайным.

Активность эндорфина в крови

Присутствие высоких концентраций эндорфинов в эндокринной железе говорит о том, что этот материал может выделяться в кровоток в активной форме и оказывать действие на отдаленный от него орган-мишень (или органы-мишени). Если это так на самом деле, то содержание циркулирующего в крови эндорфина может правильнее отражать степень использования эндорфина в какое-то определенное время, чем его содержание в железе, которое может быть стабилизировано в относительно узких пределах изменениями в скоростях синтеза и деградации.

Наши первоначальные эксперименты (Су и др., в печати) были направлены на получение данных о содержании в крови материала с химическими свойствами β-эндорфина. В качестве критериев опиоидной активности нами было выбрано: 1) подавление стереоспецифического связывания ^{3}H-эторфина в препаратах мембран мозга и 2) сниженное подавление стереоспецифического связывания ^{3}H-налоксона в присутствии 100 мМ NaCl. Предваритель-

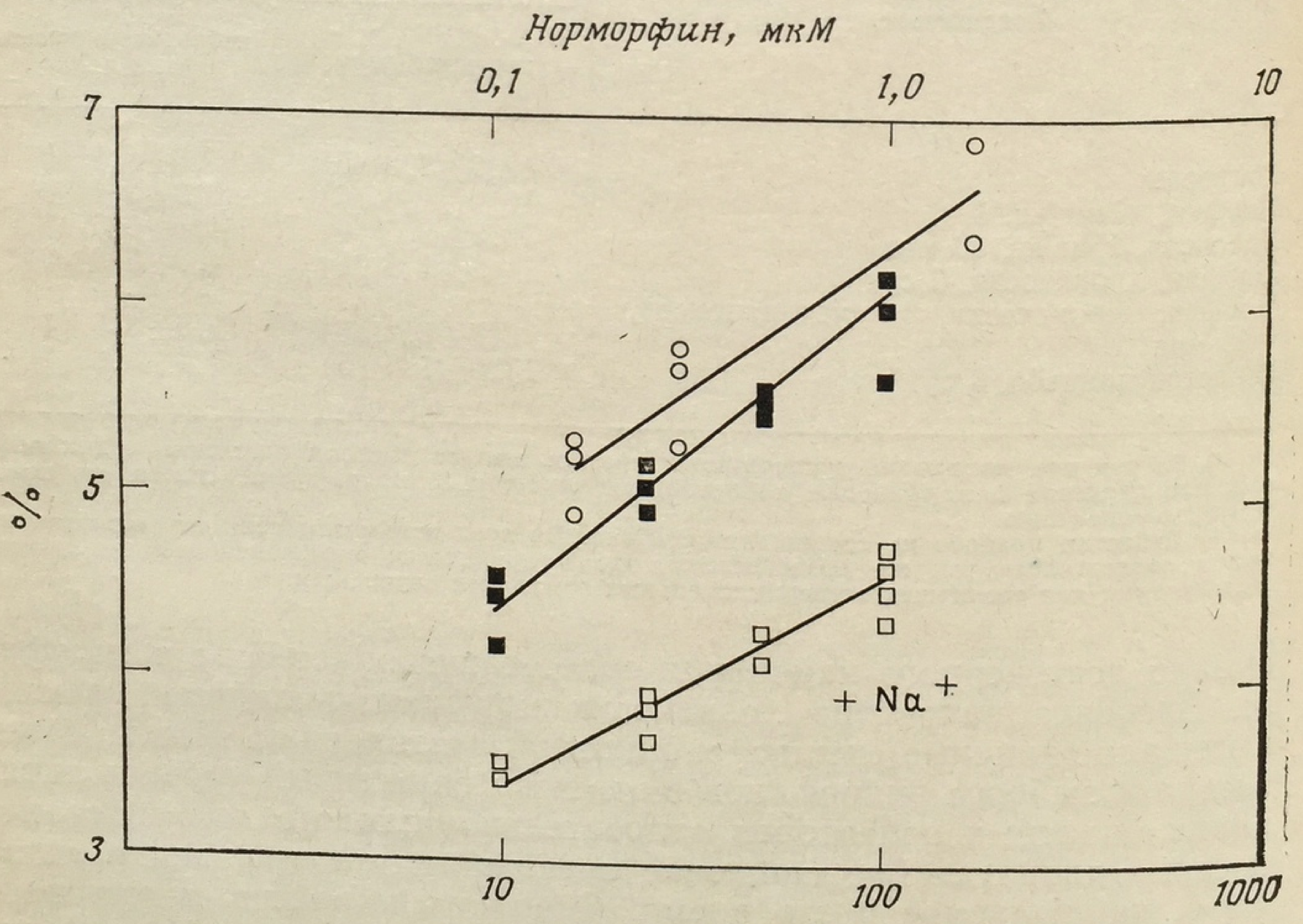


Рис. 2. Подавление стереоспецифического связывания ^{3}H-налоксона (8 нМ) экстрактами сыворотки крысы в присутствии и в отсутствие Na$^+$ (93 мМ). По оси ординат отложено подавление (%) стереоспецифического связывания, по оси абсцисс — объем (мкл) экстракта сыворотки или концентрация (мкМ) норморфина. 100 мкл экстракта сыворотки эквивалентны 4,7 мл крысиной сыворотки. Объем инкубационной смеси 500 мкл. Черные квадраты — экстракт крысиной сыворотки без Na$^+$. Светлые кружки — норморфин.

ные эксперименты показали, что ингибирующий материал с кажущимся мол. массой около 3000 дальтон может быть экстрагирован из сыворотки нескольких видов млекопитающих, хотя количественно содержание активного материала в различных образцах значительно варьирует. Имеется ряд данных о том, что экстрагированный материал обладает опиоидными свойствами; способность экстракта сыворотки крысы подавлять стереоспецифическое связывание ^{3}H-налоксона в присутствии 100 мМ NaCl снижается в 6—10 раз (рис. 2). Природа активного компонента, причины значительной вариабельности его выхода и его связь с гипофизарным эндорфином требуют дальнейшего выяснения. Можно надеяться, что многие из этих проблем будут разрешены при развитии надежных радиоиммунологических методов определения гипофизарного эндорфина, хотя трудности в однозначной идентификации индивидуальных пептидов на фоне других близкородственных пептидов и продуктов деградации не следует преуменьшать.

* * *

Мы выражаем признательность Рекхе Падхиа и Маделине Радо за квалифицированную техническую помощь.

Список литературы

1. *Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N., Leppaluoto J., Vargo T. M., Guillemin R.* Life Sci., **20**, 43—48 (1977).
2. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **69**, 950—956 (1976).
3. *Bridges T. E., Fisher A. W., Gosbee J. L., Lederis K., Santolaya R. C.* Z. Zellforsch. Microsk. Anat., **136**, 1—81 (1973).
4. *Cox B. M., Opheim K. E., Teschemacher H., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1777—1782 (1975).
5. *Elde R., Hokfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
6. *Herlant M., Ectors F., Dessy C.* C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, **274**, 1183—1186 (1972).
7. *Howe A.* J. Endocr., **59**, 385—409 (1973).
8. *Howe A., Thody A. J.* J. Endocr., **46**, 201—208 (1970).
9. *Howe A., Thody A. J.* J. Physiol. (Lond.), **203**, 159—171 (1969).
10. *Howe A., Thody A. J.* Nature, **222**, 781 (1969).
11. *Hughes J.*, Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
12. *Mains R. E., Eipper B. A., Ling N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 3014—3018 (1977).
13. *Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).
14. *Pelletier G., Leclerc R., Lebrie F., Cole J. Chretien M., Lis M.* Endocrinology, **100**, 770—776 (1977).
15. *Ross M., Dingledine R., Cox B. M., Goldstein A.* Brain Res., **124**, 523—532 (1977).
16. *Saavedra J. M., Palkovits M., Kizer J. S., Brownstein M., Zirin J. A.* J. Neurochem., **25**, 257—260 (1973).
17. *Taleisnik S., Orias R.* Endocrinology, **78**, 522—526 (1966).
18. *Terenius L., Wahlstrom A.* Acta Physiol. Scand., **94**, 74—81 (1975).
19. *Teschemacher H., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1771—1776 (1975).
20. *Thody A. J.* Neuroendocrinology, **16**, 323—331 (1974).

УЧАСТИЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ ЭНДОРФИНОВ В КОНТРОЛЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОЛАКТИНА

А. ГАЙДОТТИ, Л. ГРЭНДИСОН

(A. Guidotti, L. Grandison)

После существовавшей вначале некоторой неопределенности теперь уже установлено наличие довольно тесной корреляции между содержанием иммунохимически определяемых эндорфинов (энкефалины и β-эндорфин) [2, 8, 31] и наличием иммуногистохимически визуализируемых эндорфинсодержащих нейронов [2, 16, 29]. Наличие большой сети эндорфинсодержащих нейронов в участках, играющих важную роль в болевых ощущениях [2, 5, 8, 16, 18, 31], множественность эндогенных лигандов опиатных рецепторов [4, 11, 20, 22, 23] и их обращаемые налоксоном поведенческие эффекты [3] свидетельствуют об участии этих опиатоподобных систем в регуляции множества нейронных активностей и о возможном участии в нейропсихопатологии [2, 3, 13, 15]. Данные о стимулирующем действии β-эндорфина и энкефалинов на выброс пролактина и гормона роста [6, 21, 28] и об их присутствии в гипоталамусе [2, 8, 31] привели к современным представлениям о том, что эти пептиды, играя роль модуляторов боли и других поведенческих ответов, могут, кроме того, участвовать также в контроле нейроэндокринной функции. Недавние исследования, опубликованные частично в настоящем издании, показали следующее.

1. β-Эндорфиноподобный материал обнаруживается в больших количествах в клетках интермедиальной доли гипофиза и в кортикотропных клетках передней доли [2]; стимулы, высвобождающие АКТГ, высвобождают также в кровь эквимолярные количества β-эндорфина [2].

2. Две группы β-энкефалин-иммунореактивных нейронов локализованы в базальном гипоталамусе: одна группа локализована между дорсолатеральным и аркуатным ядрами, а вторая группа — несколько более кзади и латерально по отношению к базальному гипоталамусу [2]. Как отмечают Блюм и др. [2], «большие длинные и толстые варикозные отростки» простираются к переднему латеральному гипоталамусу и срединному возвышению, также как и к другим структурам диэнцефалона и среднего мозга.

3. Гипофизэктомия не ведет к изменению содержания эндорфинов в гипоталамусе [2, 32].

В задачу нашего исследования входило получить данные, свидетельствующие о присущей эндорфинам гипоталамуса физиологической нейромедиаторной или нейромодуляторной роли в регуляции функций гипофиза.

Данные о внутригипоталамическом действии энкефалиновых рецепторов

Несомненно, что наблюдение индуцирующего действия внутрижелудочково введенных эндорфинов на высвобождение пролактина и гормона роста интересно с фармакологической точки зрения, но не дает ответа на следующий вопрос: участвуют ли опиатные рецепторы и их эндогенные лиганды в гипоталамо-гипофизарной функции? Внутрижелудочковое введение некоторых других пептидов, в том числе тиролиберина [27], брадикинина или фактора сна [12], а также непептидных соединений [26, 27], также индуцирует высвобождение пролактина. Чтобы понять, действуют ли эти гипоталамические эндорфины сами по себе как нейроэндокринные модуляторы, мы попытались вызвать изменения в высвобождении пролактина, блокируя функционирование опиатных рецепторов налтрексоном. Как показывают данные табл. 1, системное введение налтрексона самцам крыс вызывает заметное (50—60%) снижение базальной концентрации сывороточного пролактина. Это снижение было максимальным через 1 ч после введения налтрексона (1 мг/кг) и сохранялось в течение более чем 3 ч.

Таблица 1

Влияние налтрексона на базальную концентрацию пролактина в сыворотке[1]

Временна̂я зависимость		Зависимость доза— эффект	
Время после введения (1 мг/кг в/бр) налтрексона, ч	Содержание пролактина, нг/мл сыворотки	Доза налтрексона, мг/кг	Содержание пролактина, нг/мл сыворотки
0	11,3±2,3	0	11,8±1,8
0,5	6,2±1,2[2]	0,25	8,9±1,2
1	4,8±0,7[2]	0,5	7,5±0,6[2]
2	4,9±2,6[2]	1	5,0±0,6[2]
3	5,7±1	3	4,7±0,7[2]
4	10,2±2,8	—	—
5	12,0∓3,2	5	4,5±0,5[2]

[1] Крыс Спрэг-Доули весом 180—220 г забивали декапитацией. Для изучения зависимости доза — ответ животных забивали через 1 ч после введения налтрексона. Пролактин в сыворотке измеряли с помощью радиоиммунохимического тест-набора, предоставленного NIAMD—NIH Pituitary Hormone Programm. Каждое значение представляет собой среднее для 5 крыс±средняя ошибка.

[2] $p<0,05$ при сравнении с контролем.

Кроме того, налтрексон также снижал концентрацию пролактина в сыворотке овариэктомированных самок крыс, получавших эстроген. В этих экспериментальных условиях базальное содержание пролактина составляло 187±12 нг/мл сыворотки; налтрексон (0,25 мг/кг, внутрибрюшинно) снижал этот уровень примерно на 50%.

Системное введение налтрексона могло изменить образование и высвобождение пролактина следующим путем: 1) действуя непосредственно на клетки гипофиза, 2) действуя на периферические рецепторы эндорфина с последующей модификацией нормальной регуляторной системы обратной связи, передающей сигналы к более высоким нервным центрам, 3) воздействуя на опиатные рецепторы участков мозга, влияющих на функцию гипоталамаса и 4) воздействуя прямо на опиатные рецепторы гипоталамуса. Для выявления участка, в котором осуществляется действие налтрексона, приводящее к изменению высвобождения пролактина, мы в первую очередь исследовали прямое действие налтрексона in vitro на изолированный гипофиз и действие in vivo внутригипоталамических инъекций опиатных агонистов и антагонистов. Как показано в табл. 2, налтрексон (10^{-6} или 10^{-4} М) не способен снизить высвобождение пролактина из изолированных половинок гипофиза in vitro. Наоборот, дофамин в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М снижает высвобождение пролактина приблизительно на 50%.

В другой группе экспериментов мы показали, что у самцов крысы с деафферентированным гипоталамусом системное введение налтрексона вызывает такое же снижение высвобождения пролактина, как и у интактных животных (табл. 3). В результате мы пришли к выводу, что подавление высвобождения пролактина отражает прямой эффект налтрексона на уровне гипоталамуса. Для подтверждения этого вывода мы проводили инъекцию β-эндорфина в медиобазальный гипоталамус (положение канюли контролировали гистологически) и внутрибрюшинную инъекцию налтрексона. Как показано в табл. 4, индуцированное β-эндорфином

Таблица 2

Высвобождение пролактина из половинок гипофиза[1]

Воздействие	Выделение пролактина, нг/мг ткани
Контроль	1,1±0,21
Налтрексон (10^{-6} М)	1,1±0,13
Налтрексон (10^{-4} М)	1,3±0,17
Дофамин (($5 \cdot 10^{-7}$ М)	0,4±0,1[2]

[1] Условия эксперимента те же, что описаны у Шаара и Клеменса [30].

[2] $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Каждое значение представляет собой среднее из результатов пяти экспериментов.

Таблица 3

Влияние налтрексона на концентрацию пролактина в сыворотке крыс с деафферентацией гипоталамуса[1]

Соединение	Содержание пролактина, нг/мл сыворотки	
	Интактные крысы	Деафферентация гипоталамуса
Физиологический раствор	28±3,7	22±3,1
Налтрексон	8,4+3[2]	8,7±3[2]

---

[1] Использовали крыс-самцов весом 200—220 г через 7 сут после деафферентации гипоталамуса [14]. Налтрексон (1 мг/кг; внутрибрюшинно) инъецировали за 1 ч до эксперимента. Кровь отбирали из сердца под легким эфирным наркозом. Каждое значение представляет собой среднее результатов 6 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0{,}05$ по сравнению с крысами, получавшими физиологический раствор.

высвобождение пролактина блокируется при введении налтрексона за 10 мин до пептида. Аналогично этому индуцированное морфином увеличение концентрации сывороточного пролактина у животных с деафферентацией гипоталамуса блокируется налтрексоном (данные не приведены). Кроме того, мы также наблюдали (табл. 3), что прямая инъекция налтрексона (25 нг в 1 мкл) в гипоталамус вызывает заметное снижение (40—50%) концентрации сывороточного пролактина.

В другой серии экспериментов, здесь не приведенных, мы установили также, что адреналэктомия не изменяет действия налтрексона на высвобождение пролактина. Суммируя результаты этих экспериментов, можно сказать, что физиологическое высво-

Таблица 4

Внутригипоталамическое взаимодействие налтрексона и β-эндорфина[1]

Внутрибрюшинная инъекция	Содержание пролактина при внутригипоталамической инъекции, нг/мл сыворотки			
	Физиологический раствор	Налтрексон	β-Эндорфин	α-Эндорфин
Физиологический раствор	18±2,1	9±0,7[2]	42±6,3[2]	15±2,5
Налтрексон	7,2±1,2	—	12±3[3]	—

---

[1] Самцам крыс (150—180 г) имплантировали канюлю в медиобазальный гипоталамус (4 мм A-P, 0,5 L, 8,6 D-V, Кениг, Клиппель) и спустя 3—5 сут инъецировали внутригипоталамически налтрексон, эндорфин или растворитель в объеме 1 мкл в течение 2 мин. Налтрексон (1 мг/кг) или 0,85%-ный физиологический раствор вводили внутрибрюшинно за 10 мин до внутригипоталамической инъекции. Кровь отбирали из сердца под легким эфирным наркозом через 20 мин после внутригипоталамической инъекции. Положение канюли проверяли гистологически после декапитации. Каждое значение представляет усредненный результат 5 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0{,}05$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

[3] $p<0{,}05$ при сравнении с соответствующей контрольной группой.

бождение пролактина может быть снижено при блокаде опиатных рецепторов; отсюда следует, что эндогенные лиганды опиатных рецепторов в гипоталамусе участвуют тонически в регуляции секреции пролактина при базальных условиях или в условиях стимуляции высвобождения эстрогеном.

Влияние налтрексона на индуцированное стрессом высвобождение пролактина

Способность стресса индуцировать обращаемую налоксоном анальгезию у животных и человека [1, 19, 24, 25] наводит на мысль о том, что эндогенные лиганды опиатных рецепторов могут опосредовать некоторые сенсорные и эмоциональные ответы на стресс [24]. Поскольку специфическое взаимодействие между мозгом и гипофизом оказалось критическим в адаптивном ответе организма на стимулы окружающей среды, мы решили выяснить, участвуют ли эндорфины гипоталамуса в индуцированном стрессом высвобождении пролактина у крыс. В качестве стрессорного стимула был выбран неизбегаемый шок конечностей, поскольку ранее было показано, что этот стимул вызывает зависимое от налоксона снижение болевого ответа [24]. У крыс, подвергнутых электрическому шоку конечностей (1 мА, шок в течение 1 с каждые 5 с), в течение 10 мин отмечено сильное повышение концентрации сывороточного пролактина (табл. 5); однако предваритель-

Таблица 5

Влияние налтрексона на высвобождение пролактина, вызываемое шоком конечностей, галоперидолом и резерпином[1]

Стимул	Содержание пролактина, нг/мл сыворотки	
	Физиологический раствор	Налтрексон
Контроль ($n=9$)	11±2,5	6,2±0,5[3]
Шок конечностей ($n=9$)	73±5,4[2]	15±3,7[3]
Галоперидол ($n=7$) (0,025 мг/кг; внутрибрюшинно)	68±7,9[2]	55±4,3
Резерпин ($n=9$) (2 мг/кг; внутрибрюшинно)	44±3[2]	45±6

[1] Электрический шок конечностей (1 мА, 1 с каждые 5 с) проводился в течение 10 мин непосредственно перед забоем. Галоперидол и резерпин вводили за 45 мин и 6 ч до забоя соответственно. Препараты крови получали путем декапитации через 30 мин после введения налтрексона (1 мг/кг; внутрибрюшинно).

[2] $p<0{,}05$ при сравнении с контрольными крысами, получавшими физиологический раствор.

[3] $p<0{,}05$ при сравнении обработанных налтрексоном крыс с крысами соответствующих групп, получавшими физиологический раствор.

ное введение налтрексона значительно снижает это увеличение (табл. 5).

Взаимодействие между стимуляцией опиатных рецепторов гипоталамуса и дофаминовыми нейронами срединного возвышения

Согласно результатам Фуксе и Хокфельта, дофаминсодержащие нервные терминали заметно концентрируются во внешних слоях срединного возвышения [9], а тела нейронов, соответствующие этим нервным терминалям, локализованы главным образом в аркуатном ядре [17]. Благодаря этим данным получила распространение гипотеза, согласно которой выделяющийся из нейронов срединного возвышения дофамин является главным, если не единственным, фактором, ингибирующим пролактин. Следовательно, представлялось важным, во-первых, выяснить, участвуют ли дофаминовые нейроны в индуцированном опиоидами высвобождении пролактина, а во-вторых, установить, как стимуляция или блокада опиатных рецепторов может нарушить или модифицировать действие дофаминовых нейронов. В качестве модели для изучения этого взаимодействия мы использовали введение налтрексона животным, у которых функция дофаминовых рецепторов была блокирована введением галоперидола (блокатора дофаминовых рецепторов) или резерпина (лекарственного препарата, вызывающего истощение содержания дофамина в гипоталамусе). Оба препарата (табл. 5) вызывали резкое увеличение концентрации пролактина в сыворотке нормальных самцов крысы и в сыворотке овариэктомированных самок, получавших эстрадиол (данные не приведены). Налтрексон не блокировал высвобождения пролактина, индуцированного галоперидолом или резерпином.

Заключение

Используя налтрексон в качестве инструмента для блокирования функции опиатных рецепторов, мы получили данные, подтверждающие участие эндорфинов в эндогенной модуляции высвобождения пролактина. Следовательно, большие количества обнаруживаемых иммуногистохимически и иммунорадиохимически эндорфинов в гипоталамусе необходимы, по-видимому, для осуществления какой-то физиологической функции. На самом деле налтрексон не способен подавить высвобождение пролактина из изолированных гипофизов, но оказывается эффективным, когда медиобазальный участок гипоталамуса соединен с гипофизом.

Эксперименты с шоком конечностей показывают, что эндорфиновая система гипоталамуса может обеспечивать помимо тонического контроля высвобождения пролактина также и модуляторную связь между сенсорным эмоциональным восприятием и высвобождением гормона.

Как следует из предварительных данных [10], опиатный антагонист налоксон влияет на содержание в плазме кортикостероидов (и, по-видимому, на высвобождение АКТГ) у подвергнутых стрессу мышей. Если это наблюдение подтвердится, то можно будет сделать вывод, что лиганды опиатных рецепторов гипоталамуса модулируют высвобождение не только АКТГ, но и β-эндорфина из кортикотропных клеток гипофиза. Система эндорфинов будет тогда представлять собой уникальную нейронную и гормональную систему в адаптивном ответе организма на различные стимулы окружающей среды.

Поскольку фармакологическая инактивация функций дофамина предотвращает действие налтрексона на высвобождение пролактина, то дофаминэргический тракт между аркуатным ядром и срединным возвышением может представлять конечную нейронную связь в действии опиатов. Действительно, в свете данных об анатомическом расположении эндорфинсодержащих нейронов в гипоталамусе [2] и сообщения Ферланда о том, что введение эндорфинов может оказывать влияние на функцию дофаминовых нейронов [7], представляется возможным, что эндорфины и дофамин регулируют высвобождение пролактина в соответствии с той организацией, при которой эти два нейрона действуют последовательно. Этой гипотезе соответствует отсутствие прямого пролактин-освобождающего действия эндорфинов (β-эндорфина или энкефалинов) при непосредственном воздействии на половинки гипофиза in vitro [6, 28]. Однако нейроанатомическую связь опиатов с дофаминовыми и другими нейромедиаторными системами гипоталамуса трудно установить, основываясь только на фармакологических экспериментах. Чтобы иметь возможность делать какие-либо выводы о роли различных предполагаемых нейромедиаторов в высвобождении гормонов гипофиза, необходимо прежде осуществить электрофизиологическое или иммуногистохимическое определение внутригипоталамической активации нейронов, запасающих лиганды опиатных рецепторов.

Список литературы

1. *Akil H., Mayer D. J., Liebeskind J. C.* Science, **191**, 961—962 (1976).
2. *Bloom F. E., Rossier J., Battenberg E. L. F., Bajon A., Prench E., Henriksen J., Siggins G. R., Segal D., Browne R., Ling N., Guillemin R.*, данное издание (1977).
3. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
4. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Birdsall N. J. U., Hulme E. C.* Nature, **260**, 793—795 (1976).

5. *Dill R. E., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 323—326 (1977).
6. *Dupont A., Cusan L., Garon M., Labrie F., Li C. H.* Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 358—359 (1977).
7. *Ferland L., Fuxe K., Eneroth P., Gustafsson J. A., Skett P.* Eur. J. Pharmacol., **43**, 89—90 (1977).
8. *Fratta W., Yang H.-Y. T., Hong J., Costa E.* Nature, **268**, 452—454 (1977).
9. *Fuxe K., Hokfelt T.* In: Frontiers in Neuroendocrinology, eds. W. F. Ganong and L. Martini, pp. 47—96, Oxford University Press, London (1969).
10. *Gibson A., Ginsburg M., Hall M., Hart S. L.* J. Physiol., **270**, 28—33 (1977).
11. *Goldstein A.* Science, **193**, 377—383 (1976).
12. *Grandison L., Guidotti A.* (1977). In preparation.
13. *Gunne L. M.. Lindstrom L., Terenius L.* J. Neurotransmission, **40**, 13—18 (1977).
14. *Halasz B., Pupp L.* Endocrinology, **77**, 553—562 (1965).
15. *Herz A.*, this volume.
16. *Hokfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neuroscience Ltrs, **5**, 25—31 (1977).
17. *Hokfelt T., Johansson O., Fuxe K., Elde R., Goldstein M., Park D., Efendic S., Luft R., Fraser H., Jeffcoate S.* In: Advances in Biochemical Psychopharmacology, Vol. 16, eds. E. Costa and G. L. Gessa, pp. 99—108, Raven Press, New York (1977).
18. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 451—453 (1977).
19. *Jacobs J. J., Tremblay E. C., Colombel M. C.* Psychopharmacology, **37**, 217—223 (1974).
20. *Lazarus L. H., Ling N., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 2156—2159 (1976).
21. *Lien F. L., Fenichel R. L., Garsky V., Sarantakis D., Grant N. H.* Life Science, **19**, 837—840 (1976).
22. *Ling N., Burgus R., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 3308—3310 (1976).
23. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, **267**, 495—499 (1977).
24. *Madden J., Akil H., Patrick R. L., Barchas J. D.* Nature, **265**, 358—360 (1977).
25. *Mayer D. J.* Neuroscience Res. Prog. Bull., **13**, 13—94 (1975).
26. *Mioduszewski R. L., Grandison L., Meites L.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **151**, 44—49 (1976).
27. *Rivier C., Vale W.* Endocrinology, **101**, 506—511 (1977).
28. *Rivier C., Vale W., Ling N., Brown M., Guillemin R.* Endocrinology, **100**, 238—241 (1977).
29. *Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 2167—2171 (1977).
30. *Shaar C. J., Clemens J. A.* Endocrinology, **95**, 1202—1212 (1974).
31. *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).
32. *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Fratta W., Costa E.*, данное издание.

ВЛИЯНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ КАТЕХОЛАМИНОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС

С. АЛГЕРИ, Н. БРУНЕЛЛО, Ц. КАЛЬДЕРИНИ, А. КОНСОЛАЦИОНИ

(S. Algeri, N. Brunello, G. Calderini, A. Consolazioni)

Энкефалины представляют собой природные пентапептиды [20, 21, 30], обнаруженные недавно в различных отделах мозга млекопитающих. Было показано, что энкефалины имитируют фармакологическое действие морфина на изолированных препаратах гладких мышц [21], при связывании с опиатными рецепторами [30], при анальгезии [7, 15, 22] и при тестах на моторную активность [22]. Морфин и другие наркотические анальгезирующие средства обладают способностью стимулировать синтез дофамина [5, 9, 28] и, по-видимому, норадреналина [5]. В связи с этим представляло интерес установить, существует ли сходство между морфином и энкефалином в их биохимическом действии на катехоламины центральной нервной системы.

Поскольку продолжительность действия природных пептидов оказывается очень короткой — вследствие быстрой их инактивации эндопептидазами мозга [19, 24], требовалось разработать метод быстрой оценки скорости синтеза катехоламинов. Подходящим методом оказалось измерение включения ^{3}H-L-тирозина в катехоламины вскоре после его внутривенного введения.

В серии экспериментов, подробно обсуждаемых в другой статье [8], было показано, что введение высоких доз мет-энкефалина снижает включение меченого предшественника в дофамин стриатума (полосатого тела) и норадреналин коры головного мозга. Однако по мере увеличения концентрации эндогенного тирозина, обусловленного высвобождением этой аминокислоты из мет-энкефалина в ходе ферментативного гидролиза [19, 24], искусственное изменение удельной радиоактивности предшественника делает интерпретацию этих результатов неоднозначной. Недавно был синтезирован аналог мет-энкефалина, у которого глициновый остаток во 2-м положении цепи природного пентапептида заменен на D-аланин. Такое замещение делает пептид устойчивым к эндопептидазе, что в свою очередь приводит к усилению и пролонгированию его морфиноподобного действия [25, 32] (табл. 1 и 2). Внутрижелудочковая инъекция 1 мкг D-Ala-мет-энкефалинамида

Таблица 1

Каталептогенный эффект D-ala-мет-энкефалинамида (D-АМЭА) 1)

Время после инъекции, мин / Количество D-АМЭА на крысу, мкг	5	15	30	60
1	75	0	0	0
10	100	80	60	0
25	100	100	100	0

1) Каталепсию оценивали, помещая крыс передними лапками на полочку высотой 10 см. Результат теста оценивался как положительный, если крыса оставалась в этом положении более чем 30 с. Тест проводили на группах по 5 крыс. Результаты представлены как относительное число (%) крыс в каждой группе, дающих ответную реакцию. D-Ala-мет-энкефалинамид вводили в латеральный желудочек мозга через две постоянные канюли.

Таблица 2

Антиноцицептивное действие D-Ala-мет-энкефалинамида (D-АМЭА) 1)

Время после инъекции, мин / Количество D-АМЭА на крысу, мкг	0	5	15	30	60
1	5,7±1	9±0,4 2)	6,7±1,8	5,2±2,3	
10	6±1	11,2±2 2)	14±2,3 2)	19,8±1,2 3)	5,4±2
25	8±0,9	12,3±2,9	19,5±1,5 3)	21±2,1 3)	14,5±2 2)

1) Антиноцицептивный эффект оценивали, используя тест прищемления хвоста [27]. Эта процедура основана на определении давления (в произвольных единицах), необходимого, чтобы вызвать голосовой сигнал у испытываемой крысы. Если животное не подавало голосового сигнала после приложения 21 ед. давления (максимальное давление, позволяющее избегнуть повреждения хвоста), то записывался максимальный отсчет 21. Каждое значение представляет среднее значение единиц давления±средняя ошибка, зарегистрированное в группе из 5 крыс. Пептид растворяли в физиологическом растворе и вводили в латеральный желудочек через две постоянные канюли.

2) $p<0{,}01$ по отношению к времени 0.

3) $p<0{,}001$ по отношению к времени 0 (парный t-тест Стьюдента).

(D-АМЭА) оказывается достаточной, чтобы вызвать каталептическое состояние и увеличение порогового значения в тесте на анальгезию при сжатии хвоста. При такой малой дозе эффекты оказываются непродолжительными, но при увеличении дозы продолжительность эффекта может достигать 60 мин (табл. 1 и 2). Приведенные биохимические и фармакологические характеристики указывают, что этот пентапептид пригоден для изучения действия энкефалинов на метаболизм катехоламинов центрального происхождения.

Влияние D-Ala-мет-энкефалинамида на дофаминэргическую систему в стриатуме и лимбических областях крысы

ВЛИЯНИЕ D-ALA-МЕТ-ЭНКЕФАЛИНАМИДА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ДИОКСИФЕНИЛУКСУСНОЙ И ГОМОВАНИЛИНОВОЙ КИСЛОТ

Внутрижелудочковое введение D-Ala-мет-энкефалинамида вызывает повышение концентрации кислотных катаболитов дофамина, гомованилиновой кислоты и диоксифенилуксусной кислоты [1].

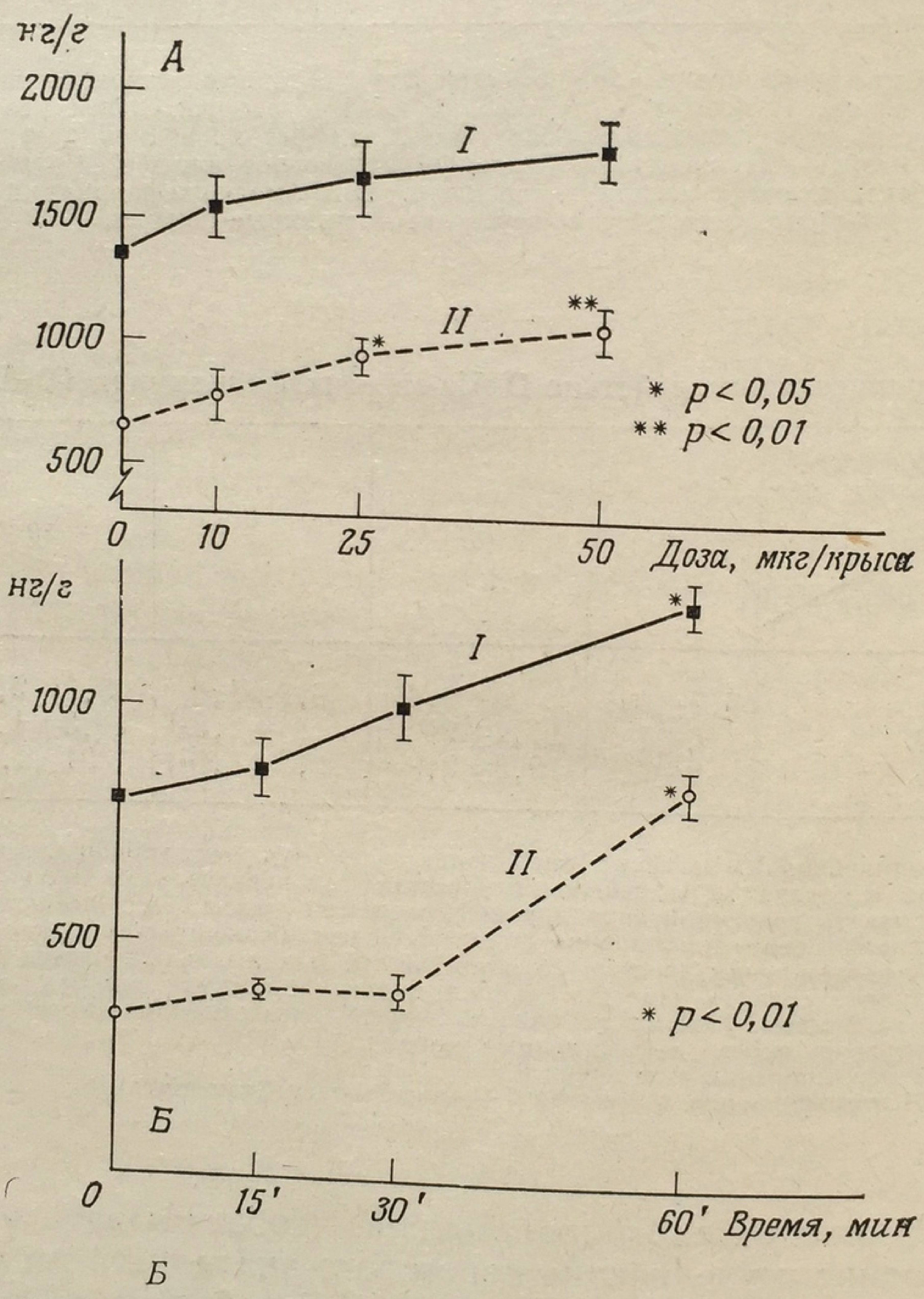


Рис. 1. *А*. График зависимости между дозой D-Ala-мет-энкефалинамида и концентрацией диоксифенилуксусной (*I*) и гомованилиновой (*II*) кислот. Пептид вводили за 45 мин до забоя животных. *Б*. Изменения концентраций диоксифенилуксусной (*I*) и гомованилиновой (*II*) кислот в стриатуме крыс через различные интервалы времени после введения 25 мкг D-Ala-метэнкефалинамида. Пептид растворяли в физиологическом растворе (10 мкл) и вводили в латеральный желудочек мозга через две постоянные канюли. Каждая точка представляет среднее значение 5 измерений ± средняя ошибка.

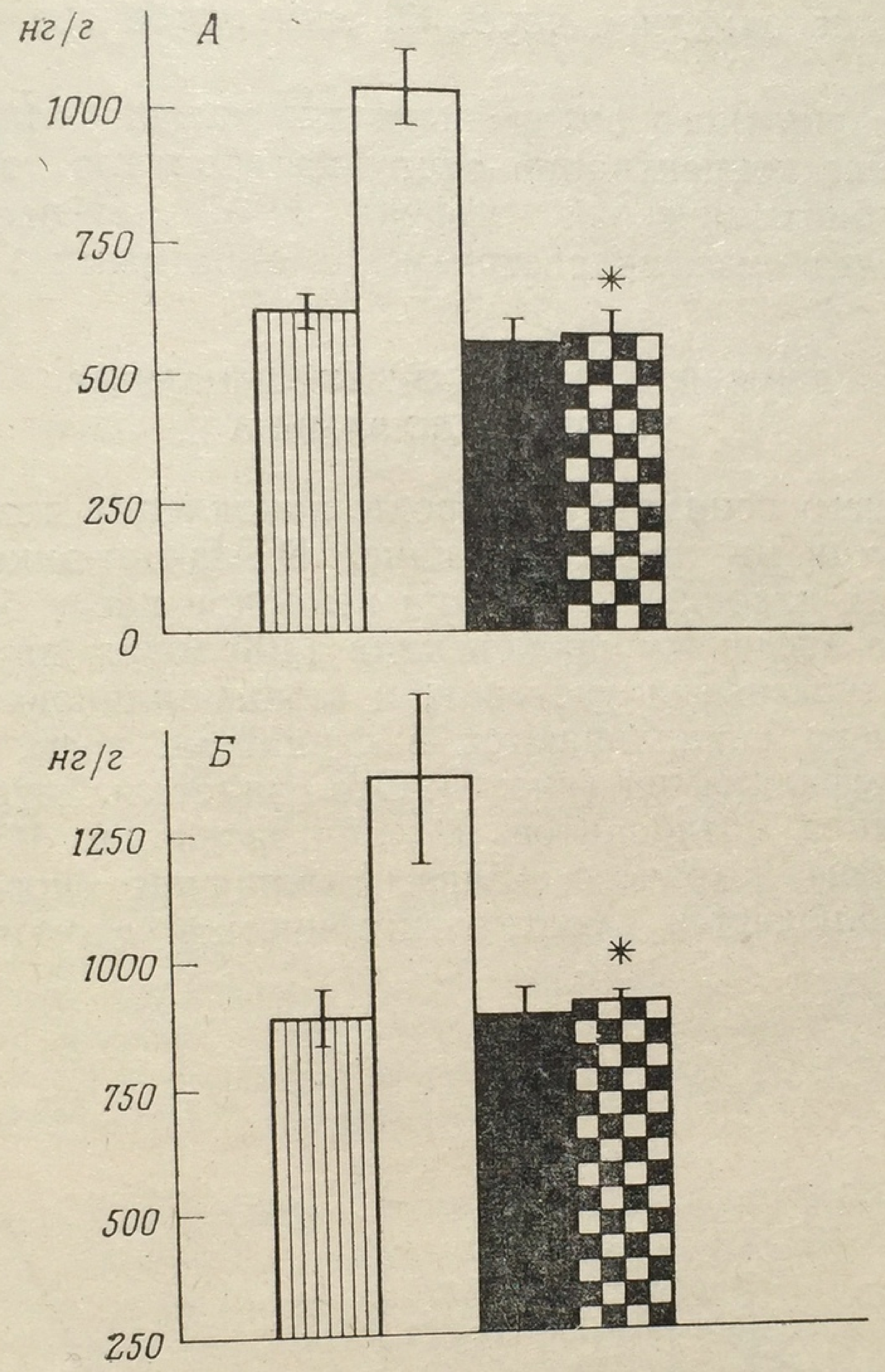


Рис. 2. Антагонистическое действие налоксона на увеличение концентраций гомованилиновой (*А*) и дифенилуксусной (*Б*) кислот в стриатуме после обработки D-Ala-мет-энкефалинамидом (D-АМЭА). Налоксон (1 мг/кг) вводили подкожно за 15 мин до инфузии пептида (25 мкг в латеральный желудочек мозга). Инъекцию налоксона повторяли через 6 мин после инфузии пептида и животных забивали через 60 мин после инфузии пептида.

Заштрихованный столбик = Физиологический раствор + Физиологический раствор
Белый столбик = Физиологический раствор + D-АМЭА
Черный столбик = Налоксон + Физиологический раствор
Шахматный столбик = Налоксон + D-АМЭА

Каждый столбик представляет среднее значение 5 измерений ± средняя ошибка.
* Отличается от группы получавших D-АМЭА крыс $p<0,01$ по факториальному эксперименту (2×2) и тесту Туке для несмешанного среднего.

При измерении концентрации этих двух катаболитов через 45 мин после введения пептида обнаруживается дозозависимое повышение их концентраций, особенно в случае гомованилиновой кислоты (рис. 1). Введение 25 мкг D-Ala-мет-энкефалинамида вызывает повышение концентраций гомованилиновой и диоксифенилуксусной кислот, особенно заметное через 60 мин после введения пептида (рис. 1).

Введение опиатного антагониста налоксона полностью подавляет увеличение концентраций обоих катаболитов дофамина; следовательно, биохимический эффект D-Ala-мет-энкефалинамида обусловлен его взаимодействием с опиатными рецепторами (рис. 2).

ВЛИЯНИЕ D-ALA-МЕТ-ЭНКЕФАЛИНАМИДА НА ОБМЕН ДОФАМИНА

Для лучшего понимания природы накопления дезаминированных катаболитов мы изучили влияние D-Ala-мет-энкефалинамида (25 мкг) на их накопление в ткани нейронов после блокирования их транспорта введением пробенецида (400 мг/кг; внутрибрюшинно) [31]. И диоксифенилуксусная, и гомованилиновая кислоты в большой степени накапливаются в стриатуме крыс, получавших D-Ala-мет-энкефалинамид (рис. 3). Это свидетельствует о повышении образования катаболитов и, следовательно, об увеличении скорости обмена исходного амина. Увеличение скорости обмена дофамина наблюдается также в лимбической системе (рис. 4),

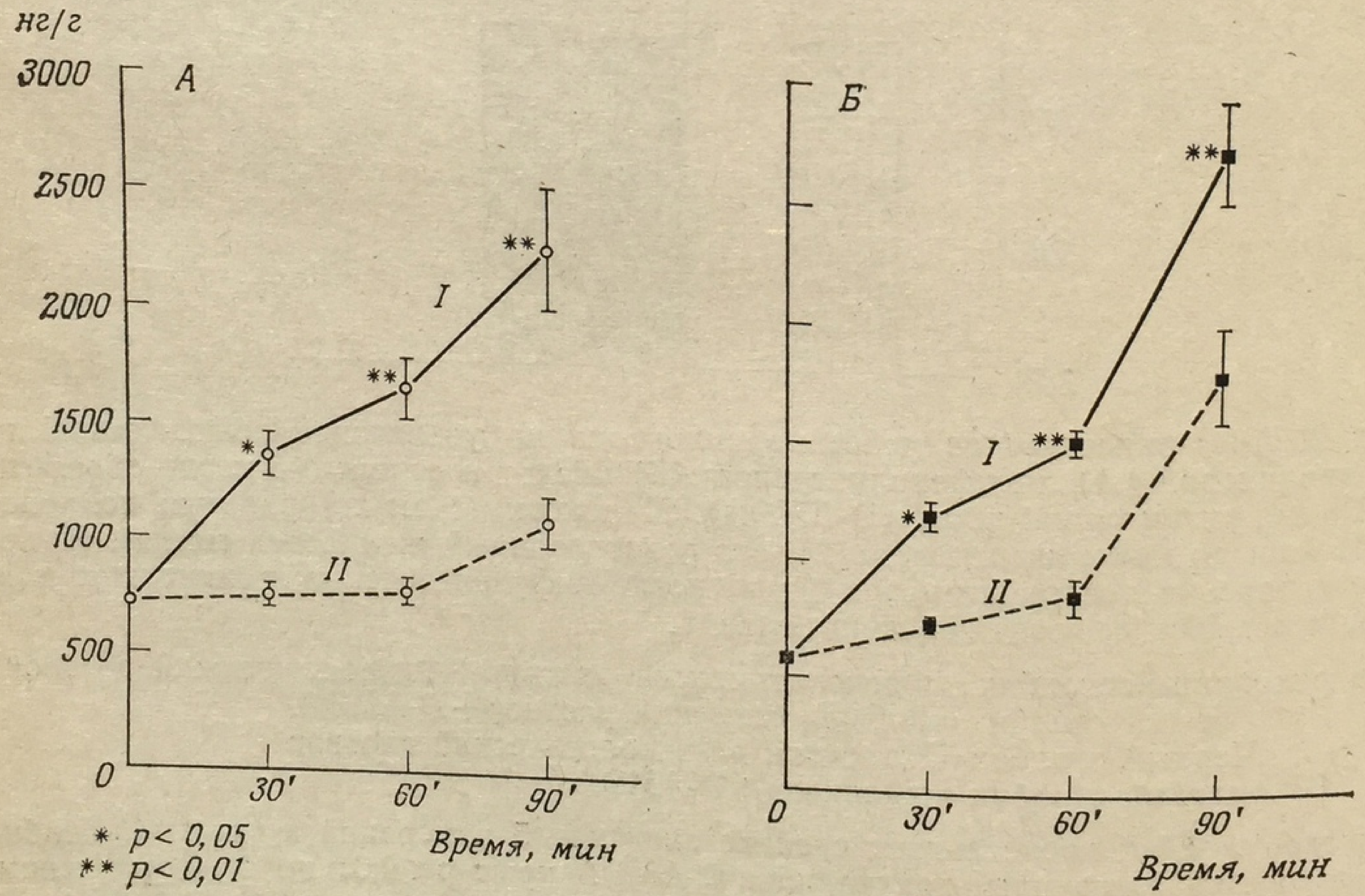


Рис. 3. Накопление диоксифенилуксусной (*А*) и гомованилиновой (*Б*) кислот после введения пробенецида (400 мг/кг; внутрибрюшинно) в стриатуме крыс, получавших внутрижелудочковые инъекции D-Ala-мет-энкефалинамида (*I* : 25 мкг/100 мкл) или физиологического раствора (*II*; 10 мкл). Пептид вводили за 5 мин до инъекции пробенецида. Каждая точка представляет собой среднее значение для 5 препаратов ± средняя ошибка. Каждая точка сравнивалась с соответствующей точкой для физиологического раствора на основе теста Туке.

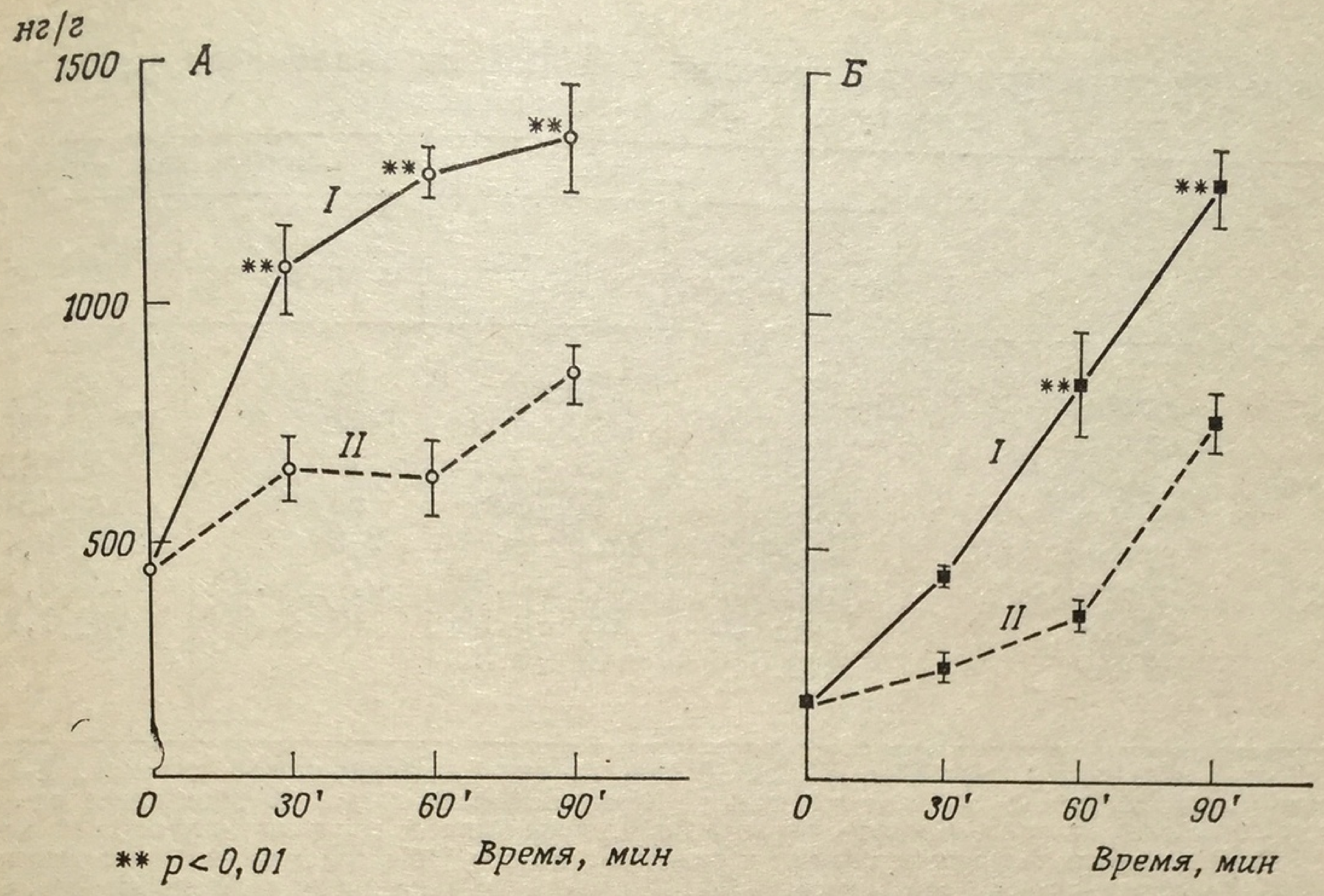


Рис. 4. Накопление диоксифенилуксусной *(А)* и гомованилиновой *(Б)* кислот после введения пробеницида (400 мг/кг; внутрибрюшинно) в лимбической системе крыс, получавших внутрижелудочковые инъекции D-Ala-мет-энкефалинамида (I; 25 мкг/10 мкл) или физиологического раствора (*II*; 10 мкл). Пептид вводили за 5 мин до инъекции пробенецида. Каждая точка представляет собой среднее значение для 5 препаратов ± средняя ошибка. Каждая точка сравнивалась с соответствующей точкой для физиологического раствора на основе теста Туке.

участке мозга, содержащем аккумбентное и центральное миндалевидное ядра. Как было показано, эти участки мозга обильно иннервированы терминалями, взаимодействующими с антителами к энкефалинам [16], и могут играть важную роль в опосредовании анальгезирующего и каталептогенного эффектов опиатов [4].

Стимулирующее действие D-Ala-мет-энкефалинамида на обмен дофамина в стриатуме подтверждается ускоряющим действием этого пептида на снижение содержания дофамина после блокады синтеза катехоламинов α-метилтирозином (250 мг/кг; внутривенно) по методу Броди и др. [16]. Как показано на рис. 5, через 1 ч после введения α-метилтирозина содержание дофамина оказывается значительно ниже в стриатуме крыс, получавших пептид за 5 мин до блокады синтеза катехоламинов. Через 2 ч после введения α-метилтирозина эти различия не выявляются, по-видимому, вследствие прекращения действия пептида.

В отличие от введения мет-энкефалина [8] введение 10 мкг D-Ala-мет-энкефалина не вызывает изменения содержания эндогенного тирозина (табл. 3); следовательно, по крайней мере в течение рассматриваемого промежутка времени (35 мин) выделение этой аминокислоты из синтетического пентапептида не происходит.

Таблица 3

Влияние внутрижелудочковой инъекции D-АМЭА на метаболизм дофамина в стриатуме и лимбической системе 1)

		Стриатум		Лимбическая система	
		Физиологический раствор	D-АМЭ	Физиологический раствор	D-АМЭ
Тирозин	нмоль/г	126±7	126±6	62±4	63±4
	нКи/г	3340—320	3700±400	1460±70	1790±255
Дофамин	нмоль/г	64±3,5	64±2,5	15±0,6	16±0,6
	нКи/г	450±44	610±23 3)	54±5,4	113±15 3)
И. П.	нмоль/г/20′	9,5±0,7	12,0±0,7 2)	2,3±0,3	3,8±0,4 3)
ДФУК	нмоль/г	3,5±0,2	5,7±0,3 4)	0,7±0,07	1,2±0,1 3)
	нКи/г	104±7,6	153±5,8 4)	19±1,3	29±1,7 4)
3-МТ	нКи/г	44±3,6	37±3,3		

1) Крысы получали 10 мкг D-АМЭА за 10 мин до внутрижелудочковой инъекции L-3,5-^{3}H-тирозина (45 Ки/ммоль; 14 мкКи на крысу). Крыс забивали через 20 мин после введения радиоактивного изотопа. Содержание тирозина, дофамина и диоксифенилуксусной кислоты (ДФУК) измеряли флуориметрически и радиометрически [18]; содержание 3-метокситирамина (3-МТ) измеряли радиометрически [18]. Синтез дофамина оценивали путем определения индекса превращения (И.П.) тирозина в дофамин по формуле И.П.=дофамин (нКи/г)/(тирозин×удельная радиоактивность) [29]. Результаты представлены как среднее семи измерений±средняя ошибка. Каждый результат получен на основании анализа полосатого тела трех крыс.

2) $p < 0,05$.

3) $p < 0,01$.

4) $p < 0,001$ (t-тест Стьюдента).

При инъекции следовых доз L-3,5-^{3}H-тирозина в латеральный желудочек мозга крыс (14 мкКи/крыса; 45 Ки/ммоль) через 20 мин после инъекции пептида (10 мкг/крыса, в желудочек) образование радиоактивного дофамина заметно усиливается (табл. 3). Это усиление отражает стимулирующее действие на синтез дофамина, о чем можно судить по увеличению индекса превращения тирозина в дофамин у крыс, получавших D-Ala-мет-энкефалинамид. На увеличение обмена дофамина указывает также и повышение содержания эндогенной и радиоактивной диоксифенилуксусной кислоты (табл. 3). С другой стороны, образование новосинтезированного 3-метокситирамина не изменяется под влиянием данного опиоида. Накопление этого катаболита может служить хорошим показателем высвобождения нейромедиаторов из нервных терминалей [13, 18]; следовательно, увеличение скорости обмена дофамина, контролируемое D-Ala-мет-энкефалинамидом, не приводит к увеличению электрической активности нейронов, а остается феноменом, ограниченным внутренней частью нейронов. Этот вывод находится в соответствии с известным ингибирующим действием энкефалинов на активность нейронов [17] и с ингибирующим действием другого опиоидного пептида, эндорфина, на высвобождение дофамина из срезов стриатума [23].

Влияние D-Ala-мет-энкефалинамида на обмен дофамина еще более заметно в лимбических участках, где индекс превращения

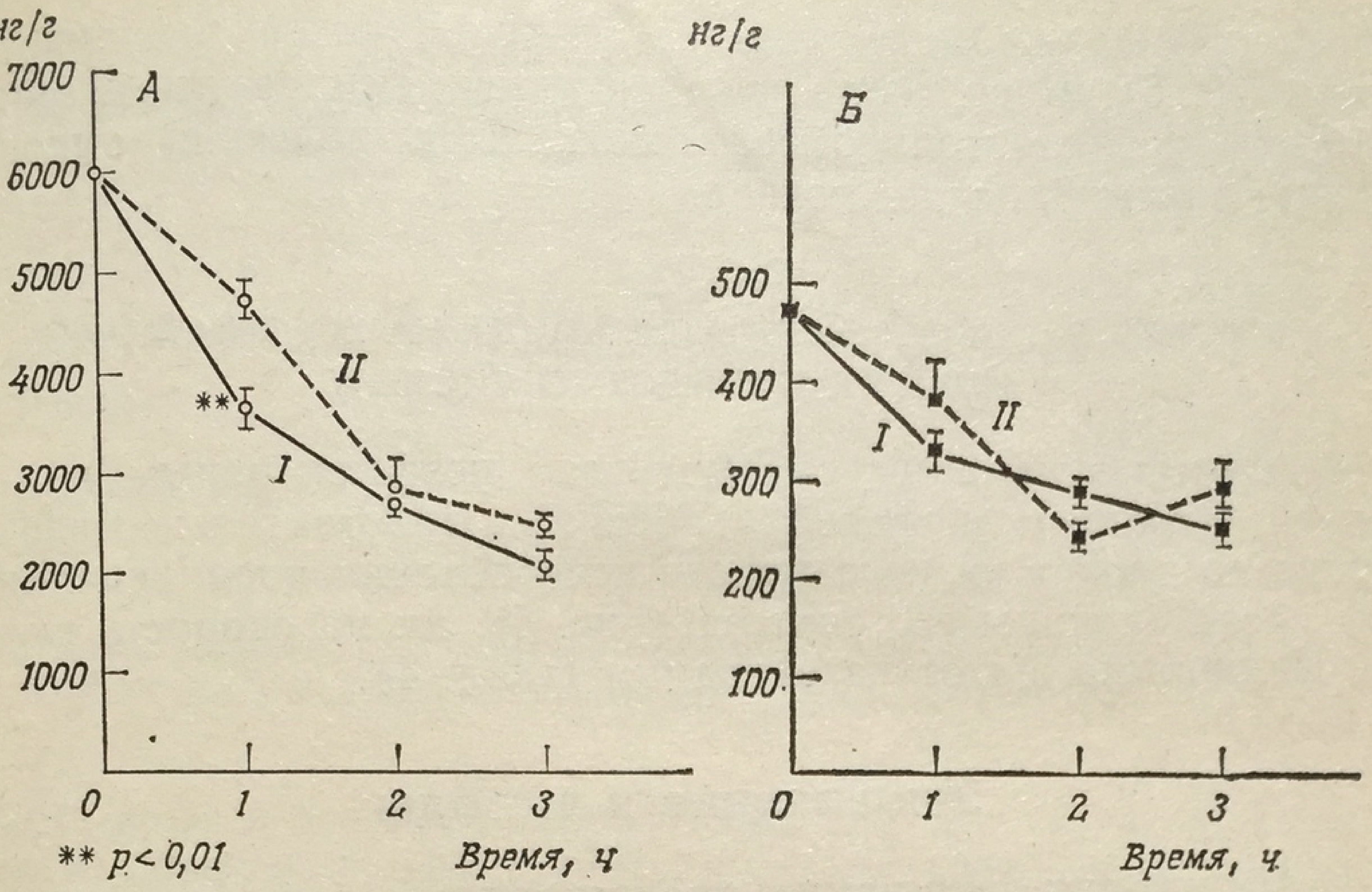


Рис. 5. Влияние введения D-Ala-мет-энкефалинамида *(А)* на снижение содержания дофамина в стриатуме и норадреналина *(Б)* в коре мозга крыс после воздействия α-метилтирозином.
D-Ala-мет-энкефалинамид *(А)* *(I*; 25 мкг/10 мкл) или физиологический раствор *(II)* вводили в латеральный желудочек мозга. Каждая точка представляет собой среднее значение 5 препаратов ± средняя ошибка. Различие между группами оценивали на основе теста Туке.

тирозина в дофамин увеличивается на 60% против 30%-ного увеличения в стриатуме (табл. 3). Это особенно интересно в свете того факта, что некоторые лимбические структуры играют особую роль в опосредовании анальгезирующего и каталептогенного эффектов опиатов [14].

ВЛИЯНИЕ D-ALA-МЕТ-ЭНКЕФАЛИНАМИДА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНУЮ К ДОФАМИНУ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ В СТРИАТУМЕ КРЫС

Действие на обмен дофамина и каталептогенный эффект D-Ala-мет-энкефалинамида свидетельствуют о нейролептоподобном механизме его действия.

Нейролептические препараты увеличивают обмен дофамина при участии механизма обратной связи, сопровождающего их блокирующее действие на постсинаптические дофаминовые рецепторы [2, 10]. В соответствии с этим взаимодействием нейролептические препараты подавляют стимулирующее действие дофамина на чувствительную к дофамину аденилатциклазу [11].

В отличие от нейролептических средств, но в соответствии с эффектом морфина [12], D-Ala-мет-энкефалинамид, добавленный к препарату аденилатциклазы стриатума, не влияет ни на базальную активность фермента, ни на стимулирующее действие дофамина (рис. 6). В соответствии с полученными результатами возможность нейролептоподобного механизма действия опиоидных пептидов может быть исключена.

ВЛИЯНИЕ D-ALA-МЕТ-ЭНКЕФАЛИНАМИДА НА КОРТИКАЛЬНУЮ НОРАДРЕНЭРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ

D-Ala-мет-энкефалин оказывается неэффективным в кортикальной норадренэргической системе. Действительно, введение пептида не влияет ни на скорость исчезновения норадреналина из коры после блокады его синтеза (рис. 5), ни на скорость включения ^{3}H-тирозина в этот катехоламин (табл. 4).

Заключение и выводы

D-Ala-мет-энкефалинамид представляет собой синтетический аналог мет-энкефалина, природного пентапептида, обладающего морфиноподобной активностью. Действие аналога на моторную ак-

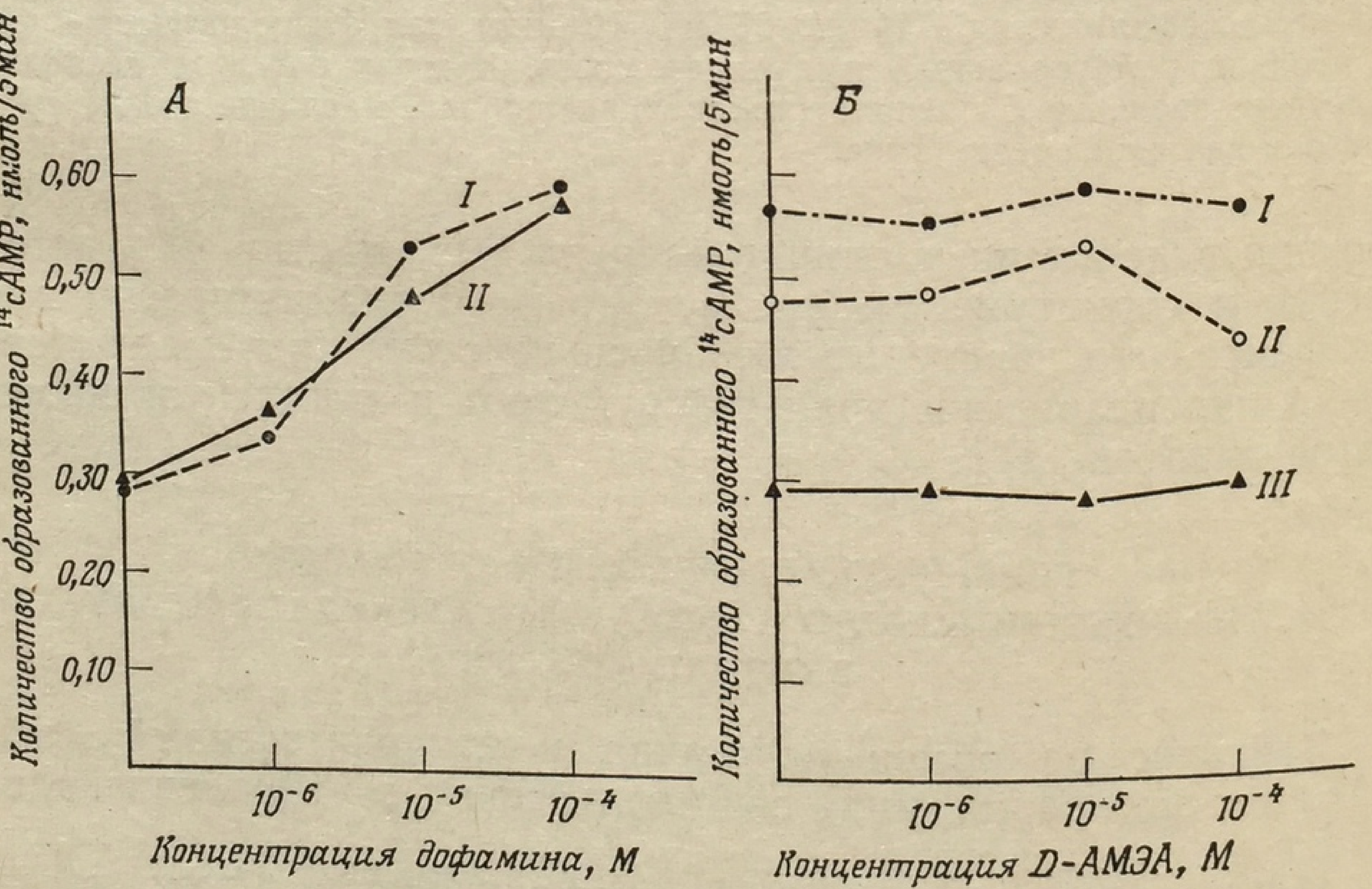


Рис. 6. Влияние D-Ala-мет-энкефалинамида *(А)* на активность in vitro чувствительной к дофамину аденилатциклазы. По осям ординат отложено количество ^{14}C-cAMP, образующегося за 5 мин. *А*. Стимулирующее действие возрастающих концентраций дофамина в препаратах полосатого тела в присутствии *(I)* или в отсутствие *(II)* D-Ala-мет-энкефалинамида. *I* — активность, стимулированная D-АМЭА (10^{-5} М), *II* — нормальная активность. *Б*. Влияние возрастающих концентраций D-Ala-мет-энкефалинамида, добавляемого к гомогенатам стриатума в присутствии или в отсутствие дофамина. *I* — стимулированная активность (10^{-4} М дофамин); *II* — стимулированная активность (10^{-5} М дофамин); *III* — нормальная активность.

Таблица 4

Влияние внутрижелудочковой инъекции D-Ala-мет-энкефалинамида на синтез дофамина в коре у крыс1)

		Физиологический раствор	D-Ala-мет-энкефалин
Тирозин,	нмоль/г	89±2	85±5
	нКи/г	5780±640	5280±610
Норадреналин,	нмоль/г	1,8±0,05	1,9±0,05
	нКи/г	1,3±1,4	11±0,6
И.П.,	нмоль/(г/20′)	0,2±0,01	0,17±0,01

1) Воздействие и методы такие же, как и описанные в табл. 3.

тивность крыс и его анальгезирующий эффект сильно напоминают эффекты морфина и мет-энкефалина, хотя природный пептид менее активен вследствие более быстрой инактивации эндопептидазами мозга [19, 24]. Сходство с морфином проявляется также и в биохимическом действии на дофаминэргическую систему: стимулирующее действие на обмен дофамина было твердо установлено при всех использованных нами методологических подходах, а также подтверждено результатами работы другой группы исследователей, представленными на этом симпозиуме [3].

Согласно нашим данным, этот эффект опосредуется увеличением активности тирозингидроксилазы. Влияние D-Ala-мет-энкефалинамида на дофамин обусловлено взаимодействием пептида с опиатными рецепторами, что следует из полного подавления эффекта при обработке налоксоном. Вместе с тем ясно, что эти рецепторы отличаются от постсинаптических дофаминовых рецепторов, поскольку D-Ala-мет-энкефалинамид не оказывает никакого действия на чувствительную к дофамину аденилатциклазу.

Увеличение обмена дофамина не сопровождается увеличением дофаминэргической активности нейронов, поскольку образование 3-метилтирамина, продукта выделяемого нейромедиатора, при этом не увеличивается.

Рассмотренные биохимические эффекты очень близки к тем эффектам, которые наблюдаются после воздействия антагонистами гамма-аминомасляной кислоты [13, 26]. Этот факт, а также потенцирующее действие имитирующих гамма-аминомасляную кислоту лекарственных препаратов на морфиновую анальгезию [4, 34] позволяют выдвинуть рабочую гипотезу о взаимодействии энкефалинов с дофаминэргической системой через ГАМК-эргические нейроны.

* * *

Мы приносим свою благодарность проф. Ди Белло (кафедра общей химии, Университет г. Падуя) за синтез D-Ala-мет-энкефалинамида.

Список литературы

1. *Algeri S., Calderini G., Consolazione A., Garattini S.* Eur. J. Pharmacol. (1977). In press.
2. *Andén N. E., Rubenson A., Fuxe K., Hökfelt T.* J. Pharm. Pharmacol., **19**, 627—629 (1967).
3. *Biggio G.* Данное издание (1977).
4. *Biggio G., Della Bella D., Frigeni V., Guidotti A.* Neuropharmacology, **16**, 149—150 (1977).
5. *Bloom A. S., Devey W. L., Harris L. S., Brosius K. K.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **198**, 33—41 (1976).
6. *Brodie B. B., Costa E., Dlabac A., Neff N. H., Smookler H. H.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **154**, 493—498 (1966).
7. *Büscher H. H., Hill R. C., Römer D., Cardinaus F., Closse A., Hauser D., Pless J.* Nature, **261**, 423—425 (1976).
8. *Calderini G., Consolazione A., Garattini S., Algeri S.* Submitted for publication (1977).
9. *Carenzi A., Guidotti A., Revuelta A., Costa E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **194**, 311—318 (1975).
10. *Carlsson A., Lindqvist M.* Acta Pharmacol. Toxicol. (Kbh.), **20**, 140—144 (1963).
11. *Clement-Cormier Y. C., Kebabian J. W., Petzold G. L., Greengard P.* Proc. Natl. Acad. Sci., **71**, 1113—1117 (1974).
12. *Di Chiara G., Vargiu L., Porceddu M. L., Longoni R., Mulas A., Gessa G. L.* In: Advances in Biochemical Psychopharmacology, vol. 16, Non striatal dopaminergic neurons, eds. E. Costa, G. L. Gessa, pp. 371—375, Raven Press, New York (1977).
13. *Di Giulio A. M., Groppetti A., Cattabeni F., Maggi A., Algeri S.* Paper presented at the First meeting on the European Society of Neurochemistry Bath (1976).
14. *Dill R. E., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 323—326 (1977).
15. *Duggan A. W., Hall J. G., Headley P. M.* Nature, **264**, 456—458 (1976).
16. *Ede R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
17. *Frederickson R. C. A., Norris F. N.* Science, **194**, 440—442 (1976).
18. *Groppetti A., Algeri S., Cattabeni F., Di Giulio A. M., Galli C. L., Ponzio F., Spano P. F.* J. Neurochem., **28**, 193—197 (1977).
19. *Hambrook K. J. M., Morgan B. A., Rance M. J., Smith C. F. C.* Nature, **262**, 782—783 (1976).
20. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
21. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—579 (1975).
22. *Jacquet Y. F., Marks N.* Science, **194**, 632—635 (1976).
23. *Loh H. H.. Brase D. A., Sampath-Khanna S., Mar J. B., Way E. L., Li C. H.* Nature, **264**, 567—568 (1976).
24. *Meek J. L., Yang H. Y. I., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 151—154 (1977).
25. *Pert C. B., Pert A., Chang J. K., Fong B. I. W.* Science, **194**, 330—332 (1976).
26. *Roth H. R., Nowycky M. C., Walters J. R., Morgenroth V. H., III.* In: Advances in Biochemical Psychopharmacology, vol. 16, Non striatal dopamine neurons, eds. G. L. Gessa and E. Costa, pp. 483—488, Raven Press, New York (1977).
27. *Samanin R., Gumulka W., Valzelli L.* Eur. J. Pharmacol., **10**, 339—343 (1970).
28. *Sasame H. A., Perez-Cruet J., Di Chiara G., Tagliamonte A., Gessa G. L.* J. Neurochem., **19**, 1953—1957 (1972).
29. *Sedvall G. C., Weise V. K., Kopin I. J.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **159**, 274—282 (1968).

30. *Simantov R., Snyder S. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **73**, 2515—2519 (1976).
31. *Spano P. F., Neff N. H.* Brain Res., **42**, 139—145 (1972).
32. *Walker J. M., Berntson G. G., Sandman C. A., Coy D. H., Schally A. V., Kastin A. J.* Science, **196**, 85—87 (1977).
33. *Waymire J. C., Bjur R., Weiner N.* Anal. Biochem., **43**, 588—600 (1971).
34. *Yoneda Y., Takashima S., Kuriyama K.* Biochem. Pharmacol., **25**, 2669—2670 (1976).

НЕКОТОРЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА FK33-824, СТАБИЛЬНОГО, АКТИВНОГО ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ АНАЛОГА МЕТИОНИН-ЭНКЕФАЛИНА

Р. Ц. ХИЛЛ, Д. РЕМЕР, Х. Х. БЮШЕР

(R. C. Hill, D. Roemer, H. H. Buescher)

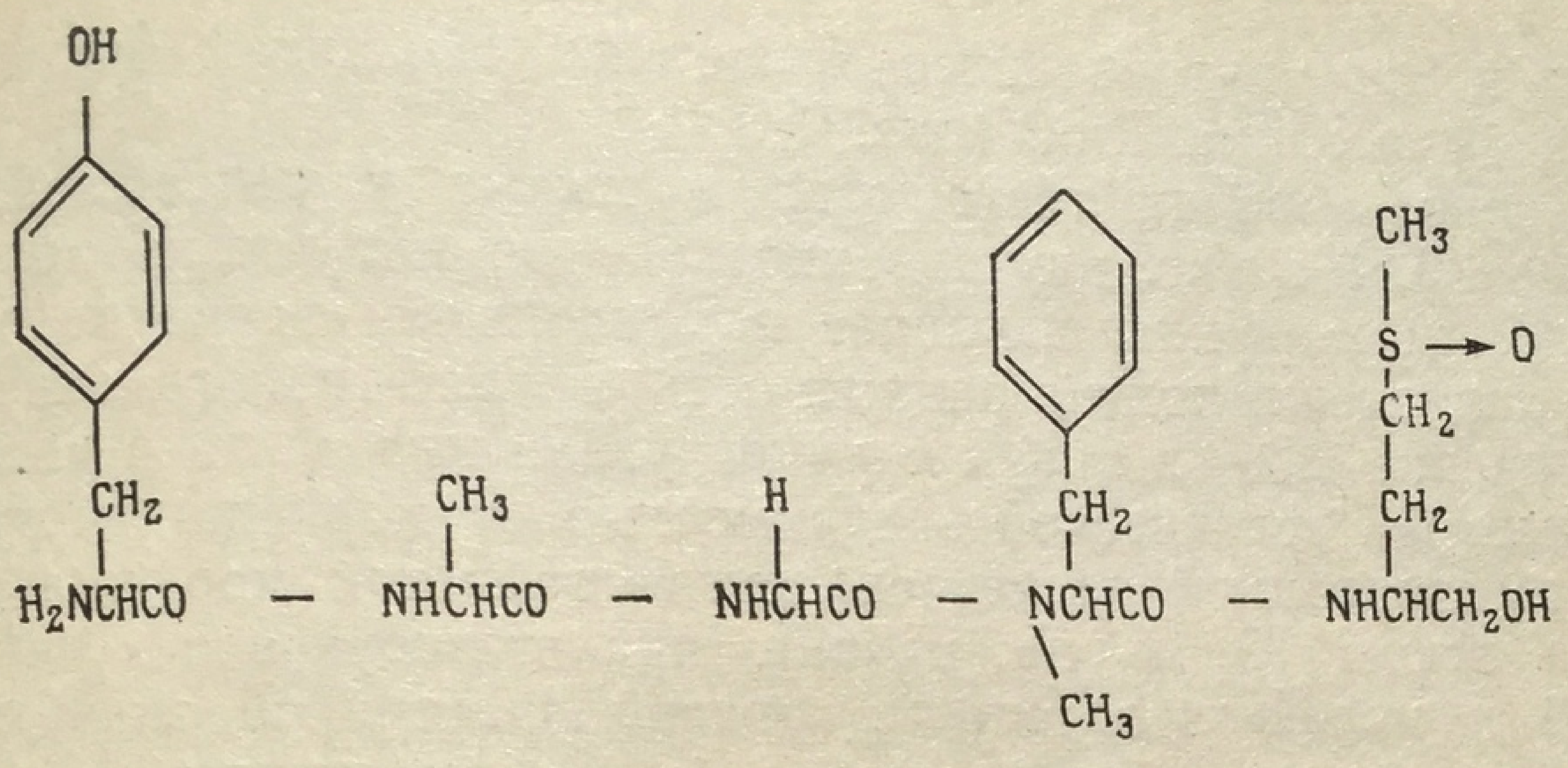
На рис. 1 приведена структура препарата FK33-824 — пентапептида, структурно родственного предполагаемому нейромедиатору — мет-энкефалину. При парэнтеральном введении FK33-824 вызывает анальгезию у мышей, крыс и макаков-резусов (табл. 1).

У мышей при использовании теста горячей пластинки FK33-824 оказывается вдвое эффективнее морфина при подкожном введении, но в 3—4 раза менее активным, чем морфин, при введении per os. У крыс при использовании метода электрической стимуляции хвоста [3] FK33-824 оказывается в 7 раз активнее морфина в подавлении двигательного рефлекса и вдвое активнее морфина в подавлении голосового сигнала. У макаков-резусов при определении методом, основанным на титровании шока [2], эффективность FK33-824 составляет одну треть от эффективности морфина при подкожном введении.

Таблица 1

Тест	Лекарственный препарат	Способ введения	ED$_{50}$, мг/кг	
Горячая пластинка (мышь)	FK 33-824	Подкожно	1,1	
		Per os	20,5	
	Морфин	Подкожно	2,1	
		Per os	5,8	
Электростимуляция хвоста (крыса)	FK 33-824	Подкожно	0,5	Моторный рефлекс
		»	0,6	Голосовой сигнал
	Морфин	»	3,3	Моторный рефлекс
		»	1,6	Голосовой сигнал
Титрование шока (макак-резус)	FK 33-824	»	1,8	Минимальная эффективная доза
		Ректально	56	
	Морфин	Подкожно	0,56	
		Ректально	>100	

При ректальном введении FK33-824 (56 мг/кг) обладает анальгезирующим действием, тогда как морфин (100 мг/кг) оказывается неэффективным. Продолжительность анальгезирующего


OH
CH$_2$
H$_2$NCHCO
CH$_3$
NHCHCO
H
NHCHCO
CH$_2$
NCHCO
CH$_3$
CH$_3$
S → O
CH$_2$
CH$_2$
NHCHCH$_2$OH

(Tyr — DAla — Gly — MePhe — Met(O) — ол)

Рис. 1. Строение пентапептида FK33-824.

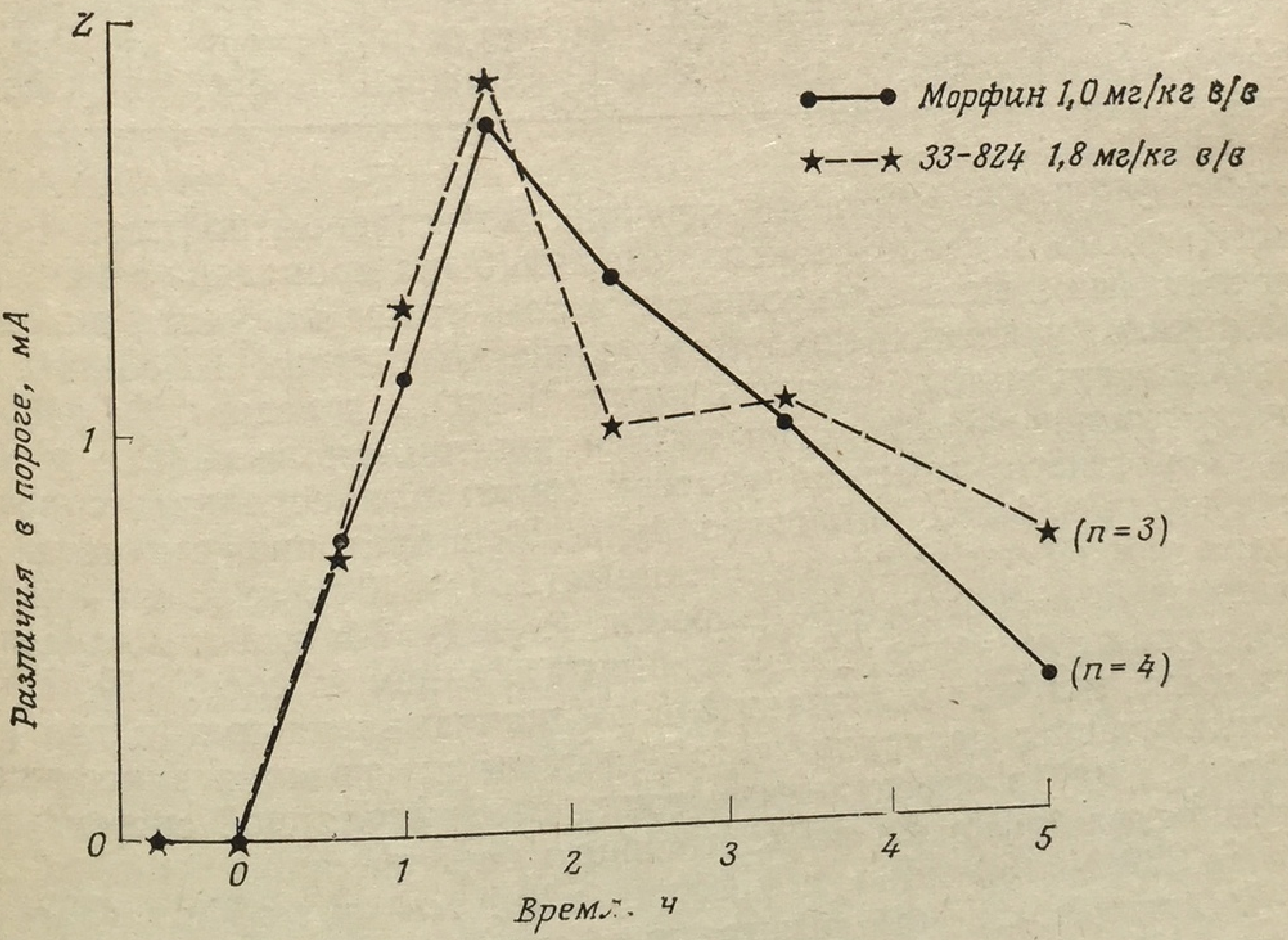


Рис. 2. Продолжительность анальгезии у макаков-резусов. Анальгезию оценивали по Борену и Мэлису [2]. По оси ординат отложены различия в пороге до и после обработки макаков-резусов.

действия после внутривенного введения обезьянам морфина и FK33-824 была одинаковой (рис. 2).

При использовании теста травмы хвоста у мышей введение налоксона (0,56 мг/кг, внутривенно) за две минуты до инъекции FK33-824 или морфина вызывает параллельное смещение вправо кривой, характеризующей зависимость анальгезивного ответа от дозы; значение ED_{50} в обоих случаях увеличивается в 4 раза.

У мышей с физической зависимостью от морфина, индуцированной имплантацией на четверо суток таблеток морфина (одна таблетка весом 75 мг на мышь), анальгезирующее действие FK33-824 и морфина в тесте с горячей пластинкой оказывается значительно ниже по сравнению с анальгезирующим действием тех же доз у независимых от морфина мышей (табл. 2). Таким образом, FK33-824 обладает перекрестной толерантностью с морфином. Помимо описанных экспериментов была проведена серия предварительных опытов на кроликах, с тем чтобы получить данные о возможных участках анальгезирующего действия FK33-824. Мы использовали метод, предложенный Герцем и сотр. [5]: рефлекс ипсилатерального сгибателя задней конечности вызывали у каждого животного, помещая участок пятки или середины подошвы конечности в фокус теплового луча. Препарат вводили через канюли, хронически имплантированные либо в 3-й, либо в 4-й желудочек, либо в сильвиев водопровод (между 3-м и 4-м желудочками), используя метод, предложенный Герцем и сотр. [5]. Принцип этого метода заключается в имплантации канюль в два различных участка вентрикулярной системы и инъекции эуцериновой мази (0,1 мл) в определенные точки вентрикулярной системы для ограничения диффузии лекарственного препарата.

Таблица 2

Лекарственный препарат	Доза (подкожно), мг/кг	Среднее время реакции, с			
		Морфин			
		Мыши с имплантацией		Мыши без имплантации	
		до воздействия	через 30 мин после воздействия	до воздействия	через 30 мин после воздействия
FK 33-824	1,0	7,5	12,8	6	18,8
	3,2	8,0	16,6	4,6	30,0
Морфин	15	8,8	19,8	5,4	30,0

FK33-824 (3,2 мкг на кролика в 0,1 мл) и морфин (320 мкг на кролика в 0,1 мл) вызывали в этих опытах одинаковый эффект (табл. 3). Блокада 4-го желудочка предотвращала анальгезирующее действие обоих препаратов, тогда как блокада 3-го желудочка и сильвиева водопровода не влияла на их анальгези-

Таблица 3

Лекарственный препарат	Участок, в который инъецировали препарат	Участок, блокированный эуцериновой мазью	КА/КИ1)
FK 33-824	3-й желудочек	Сильвиев водопровод	0/2
FK 33-824	4-й желудочек	То же	3/3
FK 33-824	Водопровод	4-й желудочек	0/2
Морфин	3-й желудочек	Сильвиев водопровод	0/2
Морфин	4-й желудочек	»	2/2

1) КА — кролики с анальгезивным ответом; КИ — кролики, получившие инъекции.

рующую активность. Следовательно, анальгезирующий эффект обоих соединений зависит частично от их действия на структуры, легко достижимые из 4-го желудочка.

Введение несколько более высоких доз FK33-824 в 4-й желудочек вызывает также заметную акинезию, характеризующуюся выраженной ригидностью мышц. Морфин, с другой стороны, не оказывает подобного действия ни при каких дозах, что указывает на различия в участках действия между этими двумя препаратами. В самом деле, ригидность мышц, обусловленная FK33-824, напоминает таковую, вызываемую β-эндорфином у крыс [1].

Продолжив на крысах исследования, проведенные нами с кроликами, мы обнаружили, что по способности индуцировать акинезию FK33-824 при введении в желудочек оказывается в 46 раз эффективнее β-эндорфина. Ригидность, индуцированная обоими соединениями, немедленно обращается низкими дозами налоксона (0,56 мг/кг, внутривенно), тогда как апоморфин лишь в значительно больших дозах (примерно 20 мг/кг, подкожно) вызывает заметное ослабление ригидности. Это находится в соответствии с результатами Изуми и др. [6], исследовавших действие β-эндорфина. Трудно сказать, указывает ли это на специфическое взаимодействие FK33-824 с дофаминэргическими механизмами, поскольку доза апоморфина 20 мг/кг является очень высокой и в 20 раз превышает дозу, необходимую для индукции стереотипного поведения у необученных животных.

Имеется несколько других сходных черт в фармакологическом действии FK33-824 и β-эндорфина. Оба препарата вызывают длительную анальгезию, причем в тесте травмы хвоста FK33-824 в 30 раз эффективнее (при расчете в молярной концентрации), чем β-эндорфин. Оба соединения вызывают толерантность и физическую зависимость [8] и обладают перекрестной толерантностью с морфином. Далее, FK33-824, подобно β-эндорфину, вызывает у крыс заметную стимуляцию секреции гормона роста и пролактина [4].

Подводя итоги, можно сказать, что FK33-824 представляет собой эффективное, длительно действующее анальгезирующее вещество, обладающее многими биологическими свойствами β-эндорфина. Помимо возможного клинического интереса доступность и стабильность FK33-824 делают его ценным инструментом в изучении действия опиоидных пептидов.

Список литературы

1. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—639 (1976).
2. *Boren J. J., Malis J. L.* American J. Physiol., **201**, 429—433 (1961).
3. *Carroll M. N., Lim R. K. S.* Arch. Int. Pharmacodyn, **125**, 383—387 (1960).
4. *Dupont A., Gusan L., Labrie F., Coy D. H., Li C. H.* Biochem. Biophys. Res. Comm., **75**, 76—82 (1976).
5. *Herz A., Albus K., Metys J., Schubert P., Teschemacher H. J.* Neuropharmacology, **9**, 539—551 (1970).
6. *Izumi K., Motomatsu T., Chretien M., Butterworth R. F., Lis M., Seidah N., Barbeau A.* Life Sci., **20**, 1149—1156 (1977).
7. *Tseng L. F., Loh H. H., Li H. C.* Nature, **263**, 239—240 (1976).
8. *Tseng L. F., Loh H. H., Li H. C.* Proc. Natl. Acad. Sci., **73**, 4187—4189, **75**, 76—82 (1976).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ЭНКЕФАЛИНЭРГИЧЕСКИМИ И ДРУГИМИ НЕЙРОННЫМИ СИСТЕМАМИ

Е. КОСТА, В. ФРАТТА, Дж. С. ХОНГ,
Ф. МОРОНИ, Х.-Ю. Т. ЯНГ
(E. Costa, W. Fratta, J. S. Hong, F. Moroni, H.-Y. T. Yang)

Хьюс и др. [8] показали, что лей- и мет-энкефалин могут служить эндогенными лигандами для опиатных рецепторов в мозгу млекопитающих. Эти два пентапептида запасаются в нейронах [1, 2], неравномерно распределены в мозгу крысы [4, 20, 21, 24] и могут рассматриваться как два предполагаемых нейромедиатора. Неизвестно, запасаются ли мет- и лей-энкефалин в одних и тех же или в различных нейронах; содержание лей-энкефалина в различных структурах мозга крыс не превышает 10—20% содержания мет-энкефалина [24]. В связи с этим можно думать, что либо в каждой структуре только малое число нейронов запасает лей-энкефалин, либо существует некоторое метаболическое взаимодействие между мет- и лей-энкефалином. Пока еще установлены не все детали метаболического расщепления энкефалинов, однако известно, что в экстрактах мозга быстрая инактивация мет-энкефалина включает в себя выделение тирозина, обусловленное активностью аминопептидазы [12]. Такая инактивация наблюдается при внутрижелудочковой перфузии мет-энкефалина [12], что ставит под сомнение представление о физиологической значимости этого механизма. В настоящее время остается неизвестным, является ли превращение мет-энкефалина в лей-энкефалин одним из этапов внутринейронного метаболизма или рецептивной инактивации мет-энкефалина.

Окажутся ли энкефалины, как это представляется сейчас, новым классом предполагаемых нейромедиаторов, будет зависеть от того, удастся ли показать, что их метаболизм и запасание могут контролироваться транссинаптически, путем активации других нейромедиаторных рецепторов. Это означает, что терминали аксона, иннервирующие энкефалинэргические нейроны, могут модифицировать хранение или метаболизм энкефалинов, образующихся и запасающихся в постсинаптических нейронах; и наоборот, активация энкефалинэргических рецепторов мозга может модифицировать хранение или метаболизм медиатора, запасаемого в нейронах, имеющих опиатные рецепторы на своих мембранах.

Несомненно, что для проверки представления о транссинаптической модуляции функции энкефалинов требуются соответствующие нейроанатомические данные о положении и реципрокном синаптическом взаимодействии других нейронов с энкефалинэргическими нейронами. Среди энкефалинэргических нейронов, которым уделялось больше внимания в биохимических и иммуногистохимических исследованиях, оказались внутренние нейроны неостриатума [2, 4]. Исследования, проведенные с применением каиновой кислоты [4], показали, что разрушение этим аналогом глутаминовой кислоты тел нейронов, присутствующих в неостриатуме, сопровождается резким снижением содержания энкефалинов. Эти данные нашли подтверждение в работах других исследователей (Шварц и др., данное издание); более того, присутствие в стриатуме энкефалинэргических тел нейронов было подтверждено иммуногистохимическими исследованиями [2] с использованием колхицина для облегчения накопления энкефалинов в телах нейронов. В других исследованиях было показано [17], что значительное количество опиатных рецепторов в стриатуме ассоциировано с дофаминовыми нейронами. Более того, изучение повреждений нейронов (К. Квелло, данное издание), приводящих к деафферентации бледного шара, указывает на существование энкефалинэргического тракта между хвостатым ядром и бледным шаром. Для изучения вопроса, действительно ли энкефалинэргические нейроны стриатума связаны транссинаптически с дофаминэргическими терминалями, мы использовали в качестве биохимического маркера содержание мет-энкефалина. Анатомические и биохимические данные [9] свидетельствуют о том, что гиппокамп представляет собой идеальную структуру для изучения энкефалинэргических синапсов с холинэргическими нейронами. Все холинэргические терминали гиппокампа имеют начало в области перегородки, характеризующейся высокой плотностью опиатных рецепторов и высоким содержанием соответствующих эндогенных лигандов [3]. Для выяснения вопроса, могут ли энкефалинэргические нейроны взаимодействовать с холинэргическим септально-гиппокампальным трактом, мы изучали метаболизм ацетилхолина в гиппокампе после прямой стимуляции перегородки или местной инъекции агонистов опиатных рецепторов.

Поскольку синаптология и цитохимия гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в базальных ядрах достаточно хорошо исследованы и поскольку эти структуры характеризуются высоким содержанием энкефалинов [3], мы изучили также влияние инъекций морфина на метаболизм ГАМК в хвостатом и аккумбентном ядрах.

Модель для изучения взаимодействия между дофаминэргическими и энкефалинэргическими нейронами в стриатуме крыс

С тем чтобы облегчить изучение взаимодействий между различными типами нейронов, мы построили предварительную модель (рис. 1), основанную на современных представлениях о цитохимии стриатума. Эта модель может предсказать нейронные взаимодействия в стриатуме крыс. Вкратце она описывает две независимые петли обратной связи, которые регулируют нигро-стриарный дофаминэргический тракт и эфферентный тракт, включающий в себя два тракта между хвостатым ядром и бледным шаром: один, по-видимому, энкефалинэргический и второй — ГАМК-эргический. Две петли, регулирующие дофаминэргические нейроны, представляют собой: 1) классическую стрио-нигральную петлю, образованную длинными аксонами нейронов и регулирующую возбудимость тел дофаминэргических нейронов, и 2) петлю коротких аксонов внутренних нейронов стриатума, которые замыкаются на дофаминэргических терминалях [17] и включают в себя энкефалинэргические нейроны (рис. 1). Эта петля регулирует количество высвобождающегося дофамина нигро-каудатными терминалями путем активации опиатных рецепторов, расположенных на терминалях дофаминовых аксонов. Функционально петля длинных аксонов фокусирует конвергентную регуляцию тела дофаминэргических нейронов со стороны различных участков стриатума, а петля коротких аксонов фокусируется на специализированных участках дофаминэргических терминалей, локализует информацию и регулирует высвобождение дофамина из терминалей независимо от изменения скорости активации дофаминовых нейронов. На рис. 1 показано, что длинные аксоны стрио-нигрального тракта, сходящиеся на телах дофаминэргических нейронов, включают в себя две параллельные группы, каждая из которых состоит из нескольких нейронных элементов; первая группа включает три типа нейронов, высвобождающих соответственно дофамин, ацетилхолин и ГАМК, а вторая серия содержит два типа нейронов, высвобождающих соответственно дофамин и вещество Р (рис. 1). По-видимому и ГАМК, и вещество Р, высвобождающиеся в substantia nigra из терминалей стрио-нигральных аксонов, действуют на дендриты дофаминэргических нейронов substantia nigra: ГАМК тормозит, а вещество Р возбуждает дофаминэргические нейроны. Чтобы построить рабочую модель, синапсы между дофаминовыми и ацетилхолиновыми нейронами или между дофаминовыми и содержащими вещество Р нейронами мы показали на рис. 1 тормозными, не имея никаких прямых доказательств этому. При блокировании дофаминэргической передачи наблюдается увеличение активности нейронов, содержащих вещество Р [5], и холинэргических нейронов [18]. Поскольку, согласно приведенной на рис. 1 модели, синапсы между ацетилхолиновыми и ГАМК-эргическими нейронами являются тормозными, то вызванное блокаторами дофаминовых рецепторов увеличение высвобождения ацетилхолина тормозит расположенные постсинаптически ГАМК-эргические нейроны. Активность длинных аксонов ГАМК-эргический нейронов, ин-

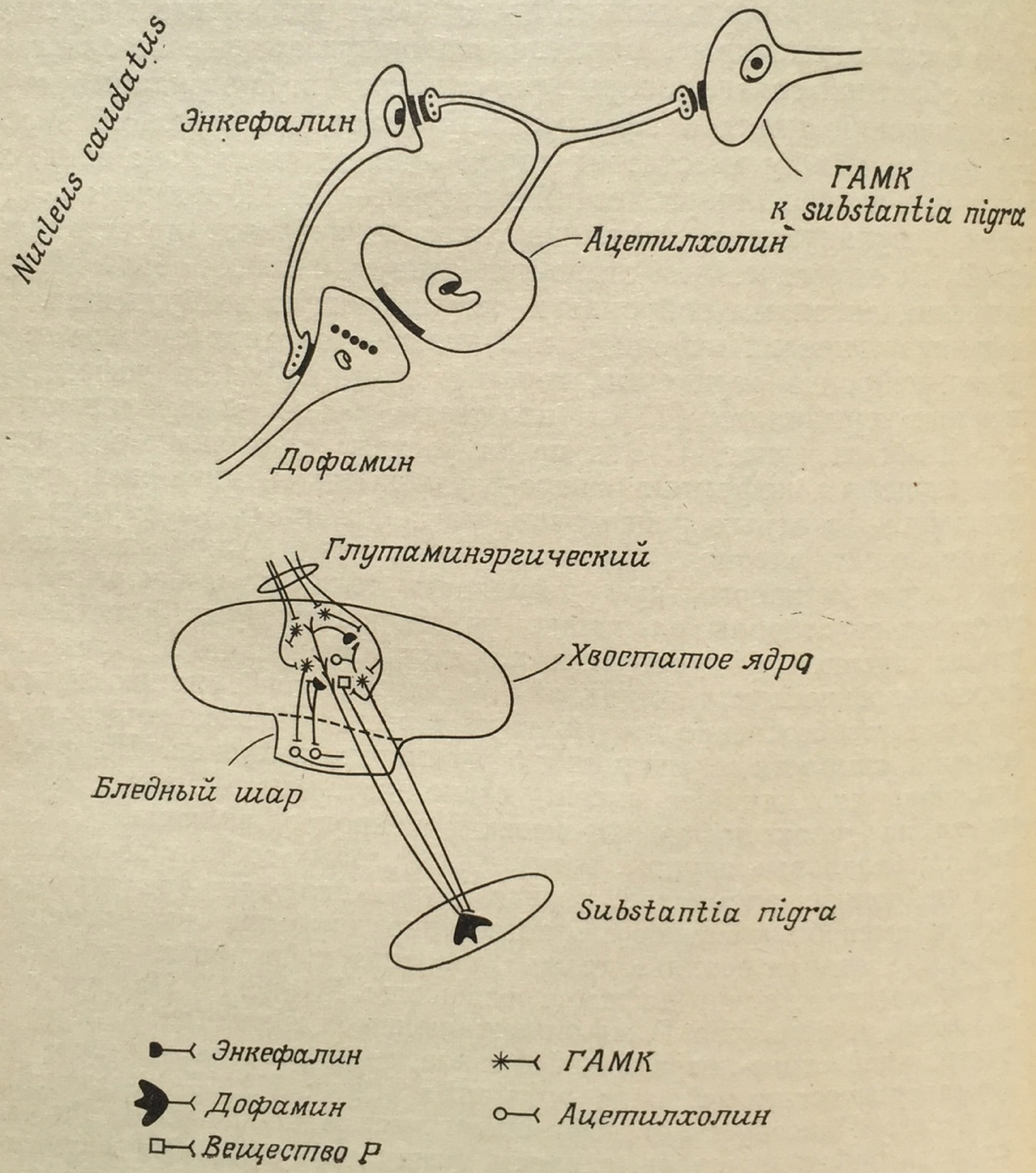

Nucleus caudatus
Энкефалин
ГАМК
к substantia nigra
Ацетилхолин
Дофамин
Глутаминэргический
Хвостатое ядра
Бледный шар
Substantia nigra
Энкефалин
ГАМК
Дофамин
Ацетилхолин
Вещество Р

Рис. 1. Схематическое изображение современных представлений о расположении различных нейронных систем в стриатуме. На верхней части приведены детали нейронной петли обратной связи, которая может регулировать энкефалинэргические нейроны стриатума; в нижней части схемы приведены современные представления об активации петли обратной связи стрио-паллидальных и эфферентных нейронов стриатума.

нервирующих substantia nigra, уменьшается, что сопровождается снижением торможения дофаминэргических нейронов в substantia nigra. Предположение о тормозном действии холинэргических нейронов подтверждается результатами экспериментов с клозапином, который одновременно блокирует дофаминовые и ацетилхолиновые рецепторы [14, 18, 22, 23].

Регуляторная петля коротких аксонов, которая является внутренней для стриатума и которая детально представлена в верхней части рис. 1, включает в себя по крайней мере три типа нейронов, высвобождающих соответственно дофамин, ацетилхолин и энкефалин. Энкефалинэргические нейроны замыкаются на дофаминовых аксонах [17] (а также Каренци, данное издание), но функция такого пресинаптического контроля неясна. И наконец, другой особенностью модели, показанной на рис. 1, является то, что ГАМК-эргические, ацетилхолинэргические и энкефалинэргические нейроны не только регулируются дофамином, но обладают также стимулирующими афферентами со стороны коры, которые, как сейчас принято считать, являются глутаминэргическими.

Проверка модели. Модуляция энкефалинэргических нейронов дофаминовыми терминалями

Мы не располагаем подходящим биохимическим зондом, с помощью которого можно было бы однозначно показать, что дофаминэргическая иннервация хвостатого ядра влияет на активность энкефалинэргических нейронов. В самом деле, мы не можем ни оценить скорость метаболизма энкефалинов, ни интерпретировать изменение равновесного содержания энкефалинов с точки зрения их метаболизма, поскольку регуляция полипептидных нейромедиаторов все еще недостаточно изучена. Для того чтобы получить некоторую информацию, мы измерили с помощью описанного ранее радиоиммунологического метода [24] содержание мет-энкефалина через различное время после односторонней гемисекции мозга. Гемисекция была ориентирована, как описано ранее [6], афференты стриарных нейронов, начинающиеся в стволе мозга, повреждались практически полностью.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что через семь дней после гемитрансекции содержание мет-энкефалина в деафферентированном стриатуме имеет тенденцию к повышению по сравнению с таковым в контрлатеральном стриатуме, хотя эти различия не были статистически достоверными. Однако через 30 сут после операции содержание мет-энкефалина в деафферентированном стриатуме оказывалось почти вдвое выше, чем на контрлатеральной интактной стороне. Чтобы удостовериться, действи-

Таблица 1

Концентрация мет-энкефалина в стриатуме крыс через различное время после гемисекции1)

Число дней после операции	Концентрация мет-энкефалина, нг/мг белка		
	интактная сторона	рассеченная сторона	р
7	10±0,70	13±1,2	$>0{,}05$
30	9,9±0,60	16±1,4	$<0{,}01$

1) $n=6$—8.

тельно ли это увеличение обусловлено моноаминэргической денервацией, мы вводили крысам резерпин и обнаружили, что хроническое введение резерпина также приводит к повышению содержания мет-энкефалина в стриатуме. Однако при использованных дозах резерпина нельзя было выяснить, участвуют ли в этом катехоламины или серотонин или же и катехоламины, и серотонин. Для выяснения природы участвующей в иннервации моноаминэргической системы мы затем вводили крысам галоперидол, специфически блокирующий дофаминовые рецепторы. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что одноразовая инъекция галоперидола (2 мг/кг, внутрибрюшинно) не изменяет содержания мет- или лей-энкефалина в стриатуме, определяемого через 2 ч после инъекции. Когда введение галоперидола повторяли ежедневно в течение 21 сут, то содержание мет- и лей-энкефалина в стриатуме увеличивалось, и это увеличение было высокодостоверным (табл. 2). Важно отметить, что содержание обоих энкефалинов увеличивается в сравнимой степени и что это увеличение происходит в одной и той же структуре. В самом деле, это одновременное увеличение может означать, что между двумя энкефалинами существует метаболическая связь.

Таблица 2

Концентрации мет- и лей-энкефалина в стриатуме крыс после хронического воздействия галоперидолом (2мг/кг в день, внутрибрюшинно)1)

Воздействие	Длительность, сут	Концентрация энкефалина, нг/мг белка	
		мет-энкефалин	лей-энкефалин
Физиологический раствор	1	10±0,60	1,5±0,10
Галоперидол	1	9,8±1,0	1,5±0,15
Физиологический раствор	21	9,5±0,80	1,4±0,12
Галоперидол	21	19±1,82)	2,4±0,102)

1) $n=6$—8.

2) $p<0{,}01$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

Таблица 3

Концентрация мет-энкефалина в хвостатом ядре и гипоталамусе крыс, получавших в течение 21 дня инъекции галоперидола (2 мг/кг в день) 1)

Структура мозга	Концентрация мет-энкефалина, нг/мг белка		
	физиологический раствор	галоперидол	p
Хвостатое ядро	9,5±0,50	18±1,6	$<0{,}01$
Гипоталамус	4,8±0,30	5,0±0,51	$>0{,}1$

1) *n*=6—8.

Специфичность действия галоперидола подтверждается тем, что увеличение содержания мет-энкефалина в стриатуме может быть достигнуто использованием меньших доз галоперидола (0,1 мг/кг в день в течение 3 недель) или сравнимых доз других каталептогенных антипсихотических препаратов [5]. Увеличение содержания мет-энкефалина, вызванное галоперидолом, затрагивает только определенные участки мозга: в частности, оно не обнаруживается в гипоталамусе (табл. 3), перегородке и гипофизе [5]. При этом галоперидол вызывает увеличение содержания мет-энкефалина в бледном шаре и аккумбентном ядре [5]. Избирательная локализация ответа в определенных участках мозга показывает, что это увеличение не обусловлено прямым действием лекарственного препарата на ферменты, регулирующие метаболизм энкефалина. Поскольку одиночная инъекция галоперидола не увеличивает содержания энкефалина в стриатуме, мы предположили существование двух модальностей в регуляции равновесного содержания энкефалинов: кратковременную, не модулируемую транссинаптически, и долговременную, которая может регулироваться транссинаптически. На основании полученных нами результатов мы заключили, что регуляция энкефалинов в стриатуме зависит частично от транссинаптического высвобождения дофамина (см. верхнюю часть рис. 1). В гипоталамусе или перегородке ключевую роль в долговременной модуляции равновесного содержания энкефалинов могут играть другие нейромедиаторы. К сожалению, данные, полученные на стриатуме, не позволяют установить, увеличивается или снижается утилизация энкефалинов при увеличении их содержания. Следовательно, мы не можем сказать, увеличивается или снижается высвобождение энкефалинов при длительном медикаментозном лечении шизофрении. В настоящее время мы разрабатываем методы, призванные ответить на этот вопрос.

Транссинаптическая модуляция эндорфинами метаболизма ацетилхолина

Действие β-эндорфина на метаболизм ацетилхолина изучали в различных структурах мозга крыс, получавших внутрижелудочковую инъекцию β-эндорфина в дозе 0,29 нмоль на крысу [14—16]. Скорость обновления ацетилхолина снижалась в бледном шаре, аккумбентном ядре, коре и гиппокампе, но не в хвостатом ядре [14—16]. В 10 раз более высокие дозы β-энкефалина также не изменяли скорости обновления ацетилхолина в хвостатом ядре. Для ограничения зоны действия β-эндорфина в перегородку мозга крыс имплантировали канюлю, и лекарственные препараты инъецировались внутриперегородочно [14, 15]. И морфин, и β-эндорфин при внутриперегородочной инъекции могли снижать скорость обновления ацетилхолина в гиппокампе, но не влияли на скорость обновления ацетилхолина в коре. Поскольку перегородка содержит ацетилхолинэргические тракты, уходящие как в гиппокамп, так и в кору [10], мы заключили, что опиатные рецепторы участвуют в регуляции септально-гиппокампального тракта, но не септально-кортикального тракта. Этот вывод был подтвержден в экспериментах, показавших, что парэнтеральное введение налоксона препятствует снижению скорости обновления ацетилхолина в гиппокампе, обусловленному внутриперегородочной инъекцией β-эндорфина [15], и, наоборот, внутриперегородочная инъекция налоксона препятствует действию введенного внутрижелудочково β-эндорфина [16]. Отсюда следует, что энкефалинэргические нейроны перегородки регулируют скорость обновления ацетилхолина в септально-гиппокампальном тракте. Однако участвующие в этом синаптические механизмы точно еще не установлены. В других экспериментах [19] было показано, что катехоламинэргические синапсы в перегородке участвуют в увеличении скорости обновления ацетилхолина в гиппокампе; в настоящее время мы пытаемся выяснить, зависит ли действие β-эндорфина на скорость обновления ацетилхолина в гиппокампе от интактной катехоламинэргической иннервации перегородки. Результаты экспериментов, в задачу которых входило установить, действует ли β-эндорфин на скорость обновления ацетилхолина в других участках мозга, показывают, что β-эндорфин снижает скорость обновления ацетилхолина в бледном шаре и аккумбентном ядре [16]. Из этого следует, что транссинаптический механизм, регулирующий количество запасаемого ацетилхолина в аккумбентном ядре и бледном шаре, отличается от такового в стриатуме. Обращаясь к схеме, приведенной на рис. 1, можно предположить, что вызванное β-эндорфином снижение скорости обновления ацетилхолина в бледном шаре может быть обусловлено одним из двух механизмов: либо лиганды опиатных рецепторов действуют непосредственно на энкефалин-ацетилхолиновые синапсы в бледном шаре (см. рис. 1), либо они модифицируют активность ГАМК-эргических нейронов, связывающих хвостатое ядро с бледным шаром, и таким образом регулируют метаболизм ацетилхолина в бледном шаре [11]. Чтобы выяснить, опосредовано ли вызванное β-эндорфином снижение скорости обновления ацетилхолина в бледном шаре действием на ГАМК-эргические механизмы, мы измерили действие морфина на скорость обновления ГАМК в хвостатом ядре. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 4. Морфин снижает скорость обновления ГАМК в хвостатом, но не в аккумбентном ядре. Действие морфина подавляется налтрексоном, который сам по себе не изменяет скорости обновления ацетилхолина в хвостатом и аккумбентном ядрах (табл. 4). С одной стороны, эти данные подтверждают нашу теперешнюю точку зрения о том, что активация дофаминэргических, энкефалинэргических, ГАМК-эргических и холинэргических нейронов в хвостатом ядре отличается от таковой в аккумбентном ядре. Но с другой стороны, само по себе снижение скорости обновления ГАМК в хвостатом ядре скорее исключает возможность того, что вызванное β-эндорфином снижение скорости обновления ацетилхолина в бледном шаре включает в себя активацию ГАМК-эргических нейронов, соединяющих стриатум с бледным шаром.

Таблица 4

Влияние морфина на обновление ГАМК в хвостатом и аккумбентном ядрах[1]

	Хвостатое ядро		Аккумбентное ядро	
	содержание ГАМК, нмоль/мг белка	$СО_{ГАМК}$, нмоль/мг белка/ч	содержание ГАМК нмоль/мг белка	$СО_{ГАМК}$, нмоль/мг белка/ч
Физиологический раствор (6)	20±1,8	640±93	36±3,0	521±71
Морфин[2] (6)	22±2,2	226±33[2]	37±4,8	455±70
Морфин[2] + налтрексон (5)	18±1,0	580±94	42±5,4	465±140

[1] $СО_{ГАМК}$ — скорость обновления ГАМК. Доза морфина составляла 70 мкмоль/кг (внутрибрюшинно). Доза налоксона составляла 15 мкмоль/кг (внутрибрюшинно).

[2] $p<0{,}01$.

Следует подчеркнуть, однако, что существует несколько пулов ГАМК в хвостатом ядре: имеются, по-видимому, три различных нейронных пула помимо пула глиальных клеток. Три ГАМК-эргических нейронных пула в хвостатом ядре представлены каудато-нигральными нейронами, каудато-паллидальными нейронами и внутренними ГАМК-эргическими нейронами. Эти морфологические наблюдения делают невозможным предсказание, какой из трех пулов ГАМК-эргических нейронов в хвостатом ядре ответствен за снижение скорости обновления ГАМК, когда скорость обновления ГАМК измеряется только в хвостатом ядре. В настоящее время мы изучаем скорость обновления ГАМК в substantia nigra и бледном шаре крыс после инъекции физиологического раствора, различных доз β-эндорфина или морфина. Результаты этих экспериментов должны выявить синаптические механизмы, поражаемые морфином в стриатуме, что дает возможность понять, каким образом морфин влияет на экстрапирамидные функции. Более того, они смогут объяснить, какие постсинаптические рецепторы участвуют в вызываемой морфином каталепсии.

Заключение

Проведенные эксперименты показали, что измерение равновесного уровня и скорости обновления предполагаемых нейромедиаторов позволяет высказать предположение о запасании энкефалинов в нейронах и сформулировать рабочую гипотезу о транссинаптическом взаимодействии между ними и другими медиаторными системами. Мы показали, что энкефалинэргические системы в стриатуме и аккумбентном ядре модулируются транссинаптически дофаминовыми синапсами. Блокирование этих синапсов вызывает накопление мет-энкефалина; осталось неизвестным, соответствует ли это накопление функциональному ингибированию. Наоборот, метаболизм ГАМК в хвостатом ядре подавляется транссинаптически энкефалинэргическими синапсами, которые, однако, не модулируют метаболизма ацетилхолина в хвостатом ядре. Метаболизм ацетилхолина в аккумбентном ядре снижается при активации энкефалинэргических рецепторов. Данные об избирательном взаимодействии между энкефалинэргическими, ГАМК-эргическими и ацетилхолинэргическими нейронными системами в септально-гиппокампальной, стрио-нигральной и стриатарной системах и в аккумбентном ядре подтверждают точку зрения о том, что энкефалин осуществляет нейромедиаторную функцию, взаимодействуя с постсинаптическими рецепторами, расположенными на мембранах нейронов перегородки, аккумбентного ядра и стриатума.

Список литературы

1. *Elde R., Hokfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **2**, 349—351 (1976).
2. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neuroscience Letters, **5**, 25—31 (1977).
3. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Fratta W., Costa E.* Brain Research, **134**, 383—386 (1977).
4. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 451—453 (1977).
5. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Costa E.* Nature (1978). In press.
6. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Racagni G., Costa E.* Brain Research, **122**, 541—544 (1977).
7. *Hong J. S., Yang H.-Y. T., Fratta W., Costa E.* J. Pharmacol. Exp. Ther. (1977). In press.
8. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—579 (1975).

9. *Kuhar M. J. Simon J. R., Rommelsforcher H.* In: Current Development of Psychopharmacology, vol. 2, eds. W. B. Essman and L. Valzelli, Spectrum Publications, New York, pp. 3—27 (1975).
10. *Lewis P. R., Shute C. C. D.* Brain, **90**, 521—539 (1967).
11. *Marco E., Mao C. C., Cheney D. L., Revuelta A., Costa E.* Nature, **264**, 363—365 (1976).
12. *Meek J. L., Yang H.-Y. T.. Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 151—154 (1977).
13. *Miller R. J., Hiley C. R.* Nature (Lond.), **258**, 596—597 (1974).
14. *Moroni F., Cheney D. L., Costa E.* Nature, **267**, 267—268 (1977).
15. *Moroni F., Cheney D. L., Costa E.* Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **299**, 149—153 (1977).
16. *Moroni F., Cheney D. L., Costa E.* Neuropharmacology (1978). In press.
17. *Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J. C.* Nature, **268**, 745—747 (1977).
18. *Racagni G., Cheney D. L., Zsilla G., Costa E.* Neuropharmacology, **15**, 723—736 (1976).
19. *Robinson S., Cheney D. L., Moroni F., Costa E.* In: Proceedings of a symposium on «Depressive Disorders», held in Rome, Italy, May 1977, ed. S. Garattini (1978). In press.
20. *Simantov R., Kuhar M. J., Pasternak G. W., Snyder S. H.* Brain Research, **106**, 189—197 (1976).
21. *Simantov R., Kuhar M. J., Snyder S. H.* Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 2167—2171 (1977).
22. *Snyder H. S., Banerjee S. P., Yamamura H. I., Greenberg D.* Science, **184**, 1243—1253 (1974).
23. *Stille G., Lavener M., Eichenberger E.* Ed. Pract. Farm., **26**, 603—625 (1971).
24. *Yang H.-Y. T., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).

СТРИАТО-ЦЕРЕБЕЛЛЯРНЫЙ ТРАКТ, КОНТРОЛИРУЮЩИЙ СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО GMP В МОЗЖЕЧКЕ. РОЛЬ ДОФАМИНА, ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ЭНКЕФАЛИНОВ

Ж. БИГГИО, М. Ж. КОРДА, М. КАЗУ, Г. Л. ГЕССА

(G. Biggio, M. G. Corda, M. Casu, G. L. Gessa)

Аксоны клеток Пуркинье представляют собой единственный выход из мозжечка, и, следовательно, эти клетки служат точками конвергенции для выхода нейронной информации из мозжечка. Клетки Пуркинье получают возбудительные импульсы по лиановидным и параллельным мшистым волокнам и тормозные импульсы от клеток, расположенных внутри мозжечка, корзинчатых и звездчатых клеток. Последние в свою очередь активируются коллатералями от лиановидных и параллельных волокон. Каждое лиановидное волокно исходит из верхнего ядра оливы и простирается непосредственно к ограниченному количеству клеток Пуркинье. Система параллельных волокон исходит из гранулярных клеток внутри мозжечка и получает главную возбуждающую афферентацию от мшистых волокон, берущих свое начало от ядер моста [1, 2]. Природа возбуждающих нейромедиаторов, выделяемых системами лиановидных и параллельных мшистых волокон, неизвестна, а роль ингибирующего медиатора различных ингибирующих афферентов клеток Пуркинье отводится гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК).

Биохимическим индикатором активности параллельных и лиановидных волокон служит содержание циклического гуанозин-3′,5′-монофосфата (cGMP) в коре мозжечка. В самом деле, фармакологически индуцированная стимуляция параллельных или лиановидных волокон увеличивает содержание cGMP в мозжечке [3—5]. И наоборот, воздействия, приводящие к повышению ГАМК-эргической активности или содержания ГАМК в мозжечке, снижают в мозжечке содержание cGMP [6—8]. И наконец, снижение ГАМК-эргической передачи или содержания ГАМК в мозжечке связано с накоплением cGMP в коре мозжечка [9, 10].

Результаты проведенных в последнее время исследований показывают, что хвостатое ядро является главным источником возбуждающих афферентов для мозжечка и что дофаминовые рецепторы в хвостатом ядре играют важную роль в активации этого тракта.

Действительно, недавние исследования показали, что ингибирование дофаминовых рецепторов в хвостатом ядре при локальном или системном введении нейролептических препаратов сопровождается резким падением содержания cGMP в коре мозжечка [11, 12]. Эффект нейролептических препаратов подавляется апоморфином, прямым стимулятором дофаминовых рецепторов, как при системном введении, так и при инъекции непосредственно в хвостатое ядро. И наоборот, введение апоморфина интактным крысам приводит к повышению содержания cGMP в мозжечке [11, 12].

Считается, что эти результаты свидетельствуют о существовании активируемого дофамином стимулирующего тракта между хвостатым ядром и мозжечком. Электрофизиологические исследования подтвердили существование каудато-мозжечкового тракта. Действительно, стимуляция хвостатого ядра вызывает два типа потенциалов в контрлатеральной коре мозжечка: первый тип регистрируется в lobulus simplex и подводится через мшистые волокна, а второй тип, регистрирующийся в paramedian lobule, подводится через лиановидные волокна [13]. Эти тракты расположены в различных участках среднего мозга, а именно в substantia nigra, zona, incerta, участке, расположенном кзади от красного ядра, и, наконец, в ядрах моста и верхнем ядре оливы, где начинаются соответственно мшистые и лиановидные волокна.

Мы изучили далее роль каудато-церебеллярного полисинаптического пути (путей) в контроле содержания cGMP в мозжечке (и, по-видимому, в контроле активности клеток Пуркинье). Для этого либо проводили повреждение нейронов, начинающихся в хвостатом ядре и в бледном шаре, либо инъецировали различные препараты, изменяющие содержание cGMP в мозжечке, в разные участки мозга, в которых, по имеющимся данным, локализованы синапсы каудато-церебеллярного мультисинаптического тракта. Полученные к настоящему времени результаты и имеющиеся литературные данные соответствуют следующей рабочей гипотезе, которая проиллюстрирована на рис. 1.

1. Между стриатумом и средним мозгом имеется тракт, который активирует мшистые и лиановидные волокна.
2. Эфферентные нейроны стриатума тонически тормозятся ГАМК-эргическими нейронами, расположенными в хвостатом ядре (в результате стриато-мозжечковый тракт (тракты) оказывается под ГАМК-эргическим тормозным контролем со стороны хвостатого ядра).
3. Тормозные ГАМК-эргические нейроны активируются холинэргическими интернейронами, расположенными в хвостатом ядре.
4. Дофамин подавляет активность этих холинэргических интернейронов. Следовательно, стимуляция дофаминовых рецепторов в хвостатом ядре (расположенных на холинэргических нейронах)

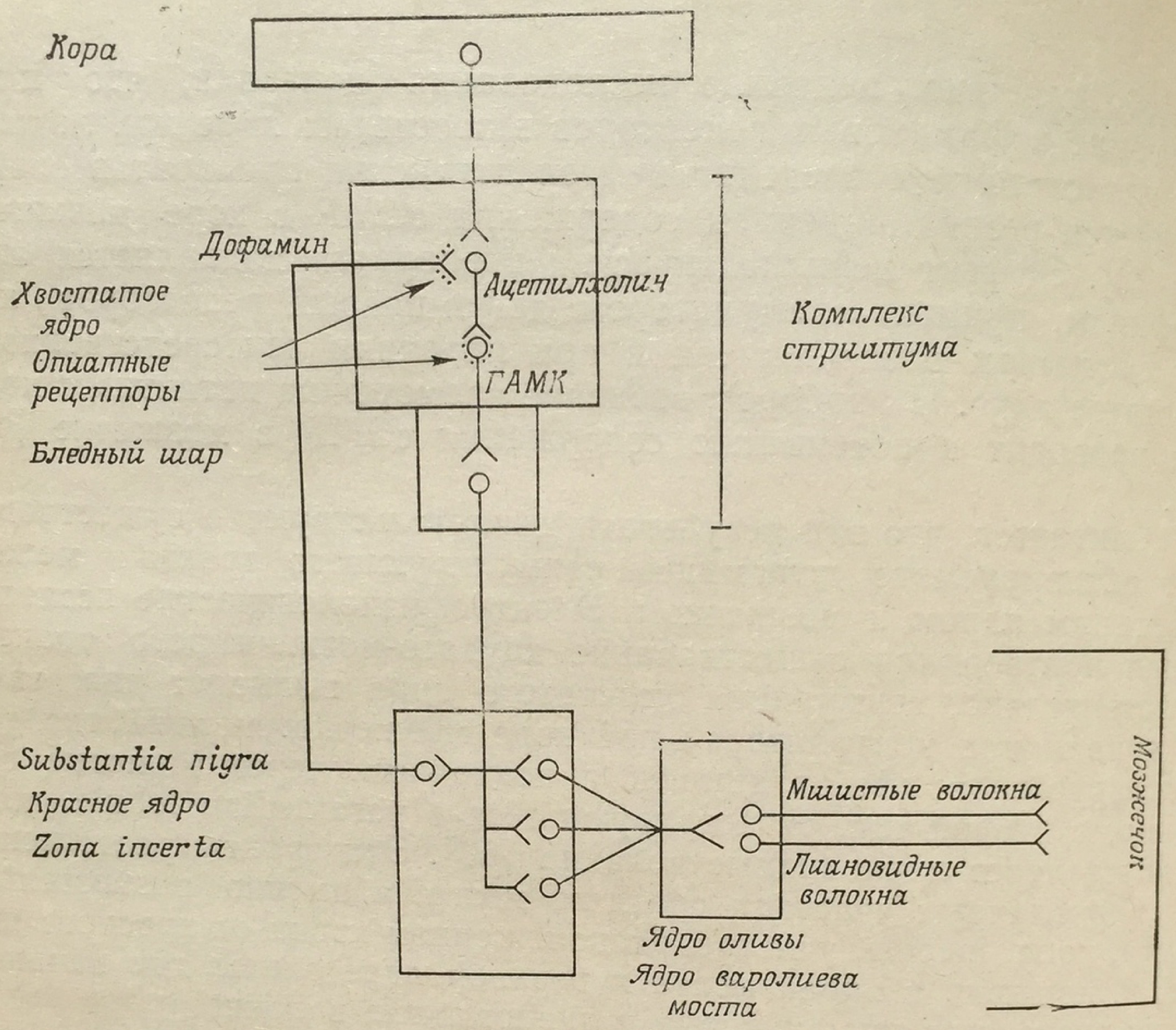

Кора
Дофамин
Хвостатое ядро
Опиатные рецепторы
Ацетилхолин
ГАМК
Комплекс стриатума
Бледный шар
Substantia nigra
Красное ядро
Zona incerta
Мшистые волокна
Лиановидные волокна
Ядро оливы
Ядро варолиева моста
Мозжечок

Рис. 1. Модель гипотетической связи между стриатумом и мозжечком.

приводит к освобождению нейронов бледного шара от тормозного контроля со стороны хвостатого ядра. Ниже мы приводим результаты, подтверждающие правильность этой гипотезы.

Влияние интрастриарной инъекции каиновой кислоты на содержание циклического GMP в мозжечке

Для выяснения роли каудато-мозжечкового тракта в контроле содержания cGMP (и, по-видимому, активности клеток Пуркинье) в мозжечке мы разрушали с помощью каиновой кислоты нейроны, выходящие из хвостатого ядра и бледного шара.

Интрастриарная инъекция каиновой кислоты, аналога глутаминовой кислоты, вызывает, как известно, дегенерацию стриарного перикариона, но оставляет интактными афферентные терминали и проходящие волокна [14, 15]. В соответствии с предшествующими результатами [14, 15] мы обнаружили, что билатеральная инъекция 2 мкг каиновой кислоты в хвостатое ядро самцов крыс

Спрэг-Доули (вес 270—300 г) (координаты A=8,1; L=2,8; DV==1,5 по Пеллегрино и Кухману [16]) вызывает заметную потерю перикарионов, распространяющуюся на всю головку и тело хвостатого ядра и большую часть бледного шара. Повреждение распространяется также на 50% нейронов аккумбентного ядра, но не затрагивает таламуса, коры, обонятельного бугорка и хвоста хвостатого ядра.

Как и следовало из предшествующих результатов [14, 15], интрастриарная инъекция каиновой кислоты приводила к заметному снижению базальной и потере стимулируемой дофамином активностей аденилатциклазы. В самом деле, через 24 ч после инъекции каиновой кислоты дофамин полностью теряет способность стимулировать аденилатциклазу, даже будучи добавленным в концентрации 100 мкМ, максимально стимулирующей аденилатциклазу в гомогенате стриатума контрольных крыс.

С другой стороны, каиновая кислота не изменяет содержания дофамина в хвостатом ядре, увеличивает содержание его дезаминированного метаболита, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты, и вызывает активацию тирозингидроксилазы (результаты не приведены; см. [17]).

Эти данные показывают, что каиновая кислота разрушает перикарион стриатума, включая нейроны, на которых локализованы дофаминовые рецепторы, но сохраняет дофаминэргические, нигростриарные нейроны. Последние, однако, становятся гиперактивными, по-видимому, вследствие разрушения каиновой кислотой ингибиторной петли обратной связи.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что интрастриарная инъекция каиновой кислоты приводит к значительному снижению содержания cGMP в мозжечке. Содержание этого нуклеотида уменьшается почти на 80% в течение 24 ч после обработки и остается максимально сниженным через 4 дня после инъекции каиновой кислоты. Содержание циклического AMP в мозжечке не изменяется под влиянием каиновой кислоты.

Мы исследовали, влияет ли потеря чувствительной к дофамину аденилатциклазы в стриатуме на способность апоморфина и галоперидола изменять содержание cGMP в мозжечке. В соответствии с предыдущими результатами [12] апоморфин (1 мг/кг, подкожно) увеличивает, а галоперидол (1 мг/кг, внутрибрюшинно) снижает содержание cGMP в коре мозжечка интактных крыс. И наоборот, оба соединения не изменяют содержания cGMP в мозжечке крыс, получавших за 3 дня до этого инъекции каиновой кислоты (табл. 2). При этом гармалин, увеличивающий содержание cGMP в мозжечке благодаря специфической активации лиановидных волокон [5], и изониазид, действие которого связано с истощением ГАМК в мозжечке [8], увеличивают содержание cGMP в мозжечке крыс, получавших каиновую кислоту, в такой же степени, как и у контрольных крыс (табл. 3).

Таблица 1

Влияние билатеральной интрастриарной инъекции каиновой кислоты (КК) на чувствительную к дофамину аденилатциклазу в стриатуме и на содержание циклического GMP в коре мозжечка крыс[1]

Воздействие	Активность аденилатциклазы в стриатуме, пмоль/мг белка/мин		Содержание циклического GMP, пмоль/мг белка
	базальная	в присутствии дофамина	
Физиологический раствор	119±5,5	244±14,2	8,5±0,05
КК 6 ч	109±4,8	200±16,1[2]	6,8±0,07[3]
КК 12 ч	93±5,9[2]	164±12,5[3]	5,7±0,09[3]
КК 24 ч	78±4,5[2]	76±15,5[3]	2,6±0,07[3]
КК 72 ч	10±1,5[3]	10±2,1[3]	2,2±0,09[3]

[1] Каждая точка представляет собой среднее значение 5 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0,05$.

[3] $p<0,01$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

И наконец, активность гуанилатциклазы, определяемая в гомогенатах коры мозжечка, оказывается одинаковой как у контрольных крыс, так и у крыс, получавших каиновую кислоту (28±3,1 пмоль/мин на 1 мг белка).

Тот факт, что индуцированные каиновой кислотой повреждения хвостатого ядра и бледного шара сопровождаются почти полным исчезновением cGMP из мозжечка, указывает, что комплекс хвостатое ядро — бледный шар играет наиболее важную роль в контроле содержания этого нуклеотида, а по-видимому, и активности клеток Пуркинье в мозжечке. А тот факт, что потеря стри-

Таблица 2

Неспособность апоморфина и галоперидола изменять содержание циклического GMP в мозжечке крыс с билатеральным повреждением стриатума каиновой кислотой[1]

Воздействие	Концентрация, мг/кг	Содержание циклического GMP в мозжечке, пмоль/мг белка	
		контроль	повреждение каиновой кислотой
Физиологический раствор	—	8,6±0,09	2,0±0,04
Апоморфин	1	12,5±0,07[2]	2,1±0,06
Галоперидол	1	2,1±0,08[2]	2,8±0,08

[1] Каиновую кислоту инъецировали в оба стриатума, апоморфин — подкожно и галоперидол — внутрибрюшинно соответственно за 4 дня, 10 и 30 мин до забоя животных. Каждая точка представляет собой среднее значение 4 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0,001$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

Таблица 3

Влияние изониазида и гармалина на содержание циклического GMP в коре мозжечка крыс с билатеральным повреждением стриатума каиновой кислотой[1]

Воздействие	Содержание циклического GMP в мозжечке, пмоль/мг белка	
	контроль	повреждение каиновой кислотой
Физиологический раствор	$8{,}7 \pm 0{,}4$	$2{,}2 \pm 0{,}9$[2]
Изониазид, 350 мг/кг, подкожно	$22{,}2 \pm 0{,}6$[2]	$19{,}6 \pm 0{,}9$[2]
Гармалин, 3 мг/кг, внутривенно	$16{,}5 \pm 0{,}5$[2]	$11{,}7 \pm 0{,}7$[2]

[1] Каиновую кислоту, изониазид и гармалин инъецировали соответственно за 24 ч, 45 и 15 мин до забоя жвотных. Каждая точка представляет собой среднее значение 4 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p < 0{,}001$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

арной аденилатциклазы в хвостатом ядре подавляет действие апоморфина на содержание cGMP в мозжечке, подтверждает представление [11, 12] о способности дофамина контролировать содержание этого нуклеотида путем воздействия на дофаминовые рецепторы стриатума.

Представляется вероятным, что индуцированные каиновой кислотой повреждения прерывают мультисинаптический тракт, проходящий через хвостатое ядро и бледный шар, и что наиболее дистальный поврежденный нейрон располагается в бледном шаре и посылает возбуждающие сигналы на мшистые и лиановидные волокна.

Рассмотрим в связи с этим следующие данные: а) повреждение участка хвостатое тело — бледный шар каиновой кислотой оказывает такое же действие на содержание cGMP в мозжечке, как и подавление дофаминовых рецепторов в хвостатом ядре; б) подавление дофаминовых рецепторов в хвостатом ядре приводит к активации холинэргических интернейронов [18]; в) ГАМК-эргические нейроны исходят из синапсов хвостатого ядра с нейронами бледного шара. Принимая все это во внимание, мы можем предположить, что: а) возбуждающий (мультисинаптический) тракт исходит из бледного шара и достигает нижнего ядра оливы или ядер моста, аксоны которых представляют собой соответственно лиановидные и мшистые волокна; б) активность этих нейронов бледного шара тонически тормозится ГАМК-эргическими нейронами хвостатого ядра и бледного шара; в) последние нейроны активируются холинэргическими интернейронами хвостатого ядра; г) и наконец, эти холинэргические нейроны тонически тормозятся дофамином.

Влияние инъекции в бледный шар мусцимола на содержание циклического GMP в мозжечке

В соответствии с высказанной выше гипотезой холинэргическая связь должна активировать ГАМК-эргические нейроны в хвостатом ядре, которые в свою очередь подавляют выход сигнала из бледного шара. В самом деле, в своей предшествующей работе Биггио и др. [19] показали, что предварительное воздействие антихолинэргическим агентом, тригексилфенидилом уменьшает ингибирующее действие галоперидола на содержание cGMP в мозжечке. Следовательно, действие галоперидола на содержание нуклеотида требует опосредования холинэргическим синапсом.

Мы попытались проверить гипотезу о ГАМК-эргическом подавлении выхода сигнала из бледного шара путем инъекции мусцимола, эффективного ГАМК-миметического агента [20], в бледный шар через хронически имплантированную канюлю (AP=1,1; L=3; DV=7,2) [16].

Как показано в табл. 4, билатеральная инъекция мусцимола в такой низкой дозе, как 50 нг, снижает содержание cGMP в мозжечке примерно на 80%.

Таблица 4

Влияние билатеральной инъекции мусцимола в бледный шар на содержание циклического GMP в коре мозжечка крыс[1]

Воздействие	Содержание циклического GMP в мозжечке, пмоль/мг белка
Физиологический раствор, 0,5 мкл	10,6±0,9
Мусцимол, 50 нг (45 мин)	2,5±0,7[2]

[1] Каждая точка представляет собой среднее значение 5 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0{,}001$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

Снижение содержания циклического GMP в мозжечке сопровождается заметной каталепсией, продолжающейся, как и сниженное содержание cGMP, в течение примерно 2 ч. Максимальное истощение cGMP отмечено через 1 ч после инъекции, т. е. примерно в то же время, когда у животных наблюдается максимум каталептического ответа. С другой стороны, инъекция мусцимола в головку хвостатого ядра даже в такой высокой дозе, как 1 мкг, не вызывает ни каталепсии, ни снижения содержания cGMP.

Эти результаты показывают, что подавление нейронов бледного шара агонистами ГАМК вызывает такое же падение содержания cGMP, как и повреждение этих нейронов каиновой кислотой. В настоящее время мы пытаемся выяснить точную локализацию этих нейронов.

Снижение энкефалинами содержания циклического GMP в мозжечке

Если тракт между бледным шаром и мозжечком обладает только стимулирующими входами на клетках Пуркинье, то различные лекарственные препараты, влияющие на содержание cGMP в мозжечке, могут действовать на разные синапсы вдоль этого мультисинаптического тракта. Такую возможность можно проверить, инъецируя микроколичества этих препаратов в различные участки мозга, где предположительно локализованы соответствующие синапсы. И наоборот, этот подход можно использовать для выявления таких синапсов в данных участках мозга и для выяснения природы участвующих нейромедиаторов.

Опиатные агонисты, такие, как морфин и другие наркотические анальгезирующие средства, вызывают заметное снижение содержания cGMP в мозжечке [21]. Их эффект, видимо, обусловлен непрямым торможением возбуждающих афферентных путей коры мозжечка [10, 21]. Для более полного выяснения роли опиатных рецепторов в регуляции содержания cGMP в мозжечке мы изучили влияние билатеральной инъекции в стриатум D-Ala^2-мет-энкефалинамида (D-АМЭА) на содержание нуклеотида. D-Ala^2-мет-энкефалинамид представляет собой химическое производное мет-энкефалина, обладающее почти таким же сродством к опиатным рецепторам, как и эндогенный пептид, но резистентное к ферментативной деградации [22]. В соответствии с этим D-Ala^2-мет-энкефалинамид вызывает заметную и длительную анальгезию и другие опиатоподобные поведенческие эффекты при внутримозговом введении [22] и, следовательно, является удобным инструментом для изучения механизма действия эндогенных и экзогенных опиоидов.

Как показано в табл. 5, билатеральная интрастриарная инъекция D-Ala^2-мет-энкефалинамида ($AP=+8{,}1$; $L=2{,}8$; $DV=+1{,}5$) снижает содержание cGMP в мозжечке. Снижение оказывается дозозависимым, и при дозе D-Ala^2-мет-энкефалинамида 25 мкг содержание cGMP в мозжечке снижается до 30% контрольного уровня. Снижение содержания cGMP в мозжечке сопровождается заметной каталепсией, причем этот ответ тоже оказывается дозозависимым. На рис. 2 приведены временны́е параметры снижения содержания cGMP в мозжечке и разития каталепсии, вызванные D-Ala^2-мет-энкефалинамидом в дозе 25 мкг.

Максимальное снижение содержания cGMP отмечено через 1 ч после инъекции, и к этому времени у животных наблюдался максимум каталептического ответа.

Таблица 5

Снижение содержания циклического GMP в мозжечке при билатеральной инъекции D-Ala^2-мет-энкефалинамида (D-АМЭА) в хвостатое ядро[1]

Воздействие (за 60 мин до забоя)	Содержание циклического GMP в мозжечке, пмоль/мг белка
Физиологический раствор, 0,5 мкл	8,9±0,05
D-АМЭА 12 мкг	6,8±0,08[2]
D-АМЭА 25 мкг	4,2±0,06[2]
D-АМЭА 50 мкг	3,6±0,09[2]

[1] Каждая точка представляет собой среднее значение 5 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0{,}001$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

Для выяснения специфичности действия D-Ala^2-мет-энкефалинамида животным за 20 мин до его инъекции вводили внутрибрюшинно налтрексон, длительно действующий блокатор опиат-

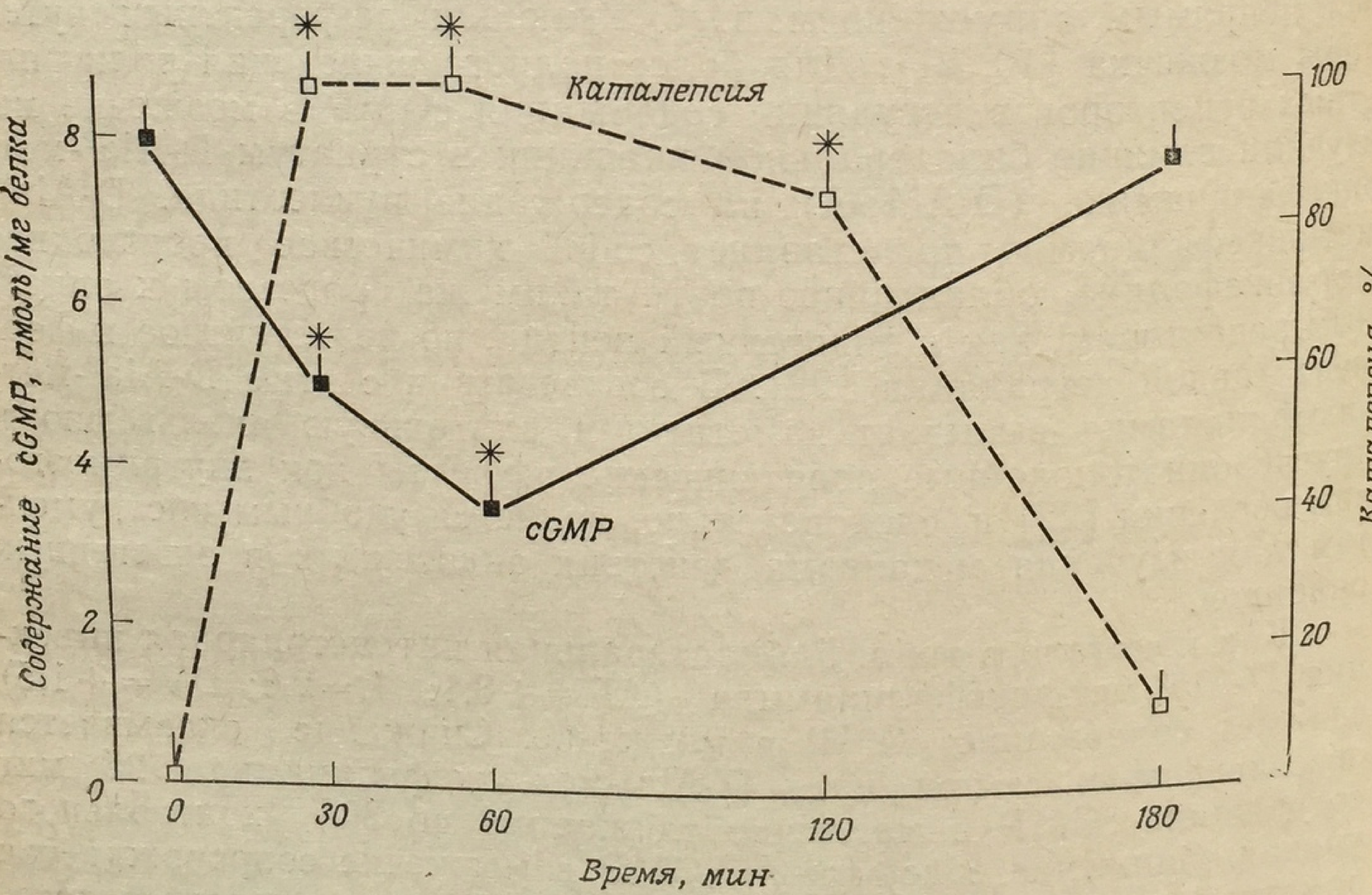


Рис. 2. Изменения во времени содержания циклического GMP в коре мозжечка и каталептического состояния у крыс после билатеральной инъекции D-Ala^2-мет-энкефалинамида (25 мкг в 1 мкл) в стриатум.

Каждая точка представляет собой среднее значение 4 экспериментов ± средняя ошибка.

* $p<0{,}01$ при сравнении с крысами, инъецированными физиологическим раствором.

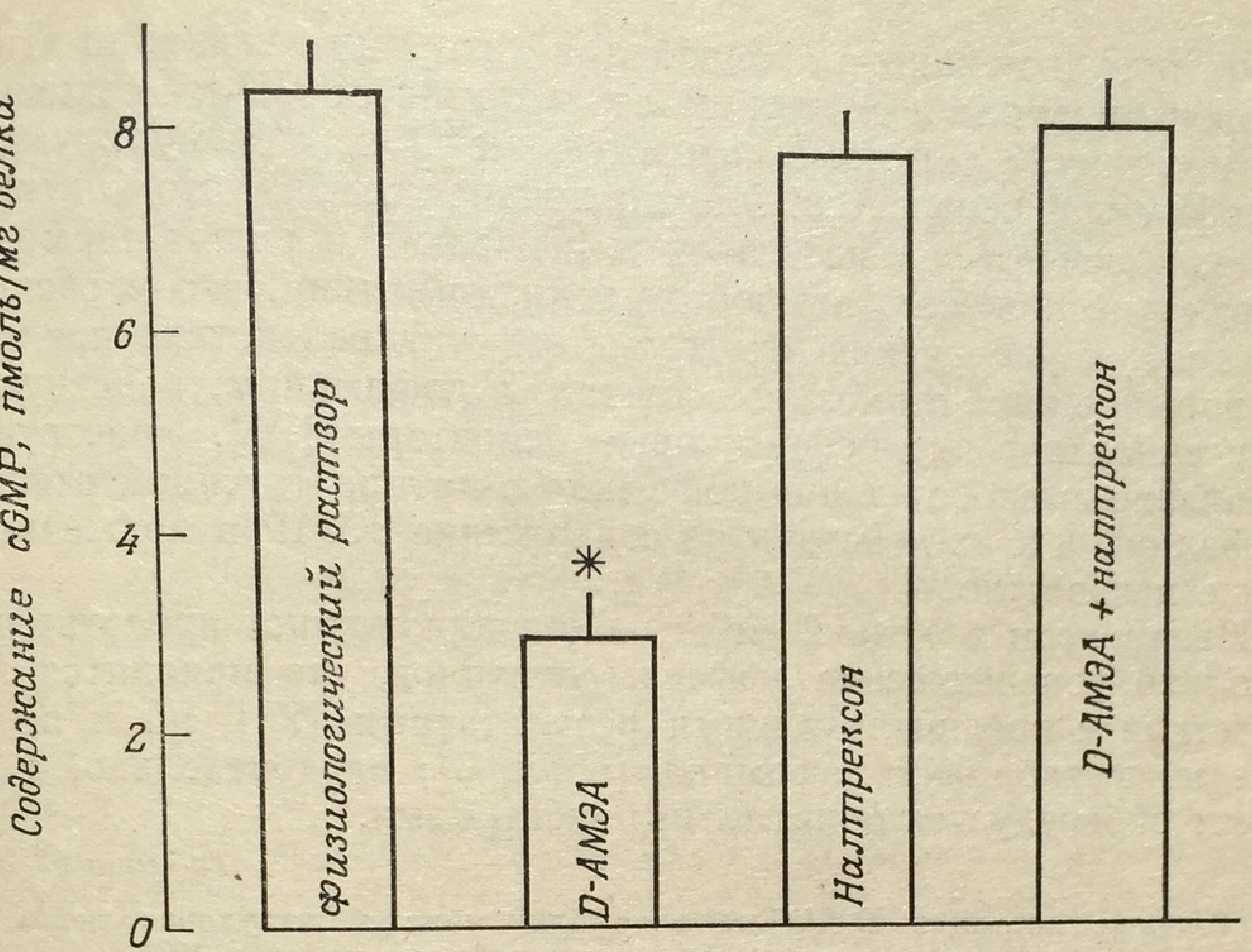


Рис. 3. Влияние налтрексона на снижение содержания циклического GMP в коре мозжечка, вызванное билатеральным введением D-Ala^2-мет-энкефалинамида (D-АМЭА; 25 мкг) в стриатум.

Каждая точка представляет собой среднее значение 4 экспериментов ± средняя ошибка.

* $p<0{,}01$ при сравнении с крысами, получавшими физиологический раствор.

ных рецепторов. Как показано на рис. 3, это соединение полностью предотвращало как снижение содержани cGMP в мозжечке, так и развитие каталептического состояния, вызванные интрастриарным введением D-Ala^2-мет-энкефалинамида. Однако, как было показано ранее [21], налтрексон сам по себе не изменял содержания cGMP. С другой стороны инъекция D-Ala^2-мет-энкефалинамида в мозжечок (AP=3,4; L=3; DV=—1) не снижала содержания cGMP и не вызывала каталепсии.

Полученные результаты показывают, что опиатные рецепторы стриатума участвуют в регуляции содержания cGMP в мозжечке. Действительно, их активация D-Ala^2-мет-энкефалинамидом вызывает заметное снижение содержания cGMP в коре мозжечка, причем этот эффект не проявляется в случае предварительной обработки антагонистом опиатных рецепторов — налтрексоном.

Влияние D-Ala^2-мет-энкефалинамида на дофаминэргическую передачу

Главной проблемой остается выяснение точной локализации опиатных рецепторов, ответственных за эффект D-Ala^2-мет-энкефалинамида и механизма, благодаря которому активация этих рецепторов приводит к снижению содержания cGMP в мозжечке.

Механизм, с помощью которого энкефалины стимулируют синтез дофамина, неизвестен. Можно предположить, что активация опиатных рецепторов на дофаминэргических нервных терминалях приводит к снижению высвобождения дофамина, что в свою очередь ведет к увеличению синтеза дофамина вследствие прекращения нормального тормозного контроля дофамином, действующим на пресинаптические дофаминовые рецепторы [26]. Участвует ли подавление высвобождения дофамина в каталептогенном ответе на энкефалины и в их действии на содержание cGMP в мозжечке, пока еще неизвестно.

Налтрексон в дозе 2 мг/кг, внутрибрюшинно, предотвращает не только поведенческие эффекты пептидов, что находится в соответствии с предшествующими результатами [22], но и их действие на метаболизм дофамина (табл. 6); следовательно, и этот эффект опосредуется опиатными рецепторами.

Таблица 6

Влияние инъекции D-Ala^2-мет-энкефалинамида в желудочек мозга на содержание диоксифенилуксусной кислоты (ДФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме[1]

Воздействие	Содержание, мкг/г	
	ДФУК	ГВК
Физиологический раствор	2,41±0,01	1,81±0,06
D-АМЭА 1,5 мкг	2,82±0,03[2]	2,54±0,02[2]
D-АМЭА 3 мкг	3,09±0,02[2]	2,91±0,03[2]
D-АМЭА 6 мкг	4,05±0,03[2]	3,21±0,05[2]
Налтрексон	2,38±0,02	1,85±0,08
Налтрексон+D-АМЭА 3 мкг	2,36±0,03	1,86±0,04

[1] Налтрексон давали в дозе 2 мг/кг, в/бр, за 15 мин до инъекции D-АМЭА. Последний вводили за 45 мин до забоя животных. Каждая точка представляет собой среднее значение 4 экспериментов±средняя ошибка.

[2] $p<0{,}01$.

Пытаясь выявить участок действия энкефалина в стимуляции обмена дофамина, мы инъецировали в хвостатое ядро D-Ala^2-мет-энкефалинамид на одной стороне и только растворитель — на противоположной стороне. Как показано в табл. 7, D-Ala^2-мет-энкефалинамид вызывает дозозависимое увеличение концентрации диоксифенилуксусной кислоты в хвостатом ядре со стороны, где проводилась инъекция. Билатеральная микроинъекция D-Ala^2-мет-энкефалинамида в дозе 3 мкг в каждое хвостатое ядро увеличивает содержание диоксифенилуксусной кислоты на 70% на обеих сторонах и вызывает каталепсию (данные не приведены).

Чтобы выяснить, участвуют ли постсинаптические дофаминовые рецепторы в хвостатом ядре в действии энкефалинов на синтез дофамина, мы изучали влияние D-Ala^2-мет-энкефалинамида на

Таблица 7

Влияние инъекции D-Ala^2-мет-энкефалинамида (D-АМЭА) в стриатум на содержание диоксифенилуксусной кислоты в интактном и поврежденном каиновой кислотой хвостатом ядре[1]

	Количество D-АМЭА, мкг	Относительное содержание диоксифенилуксусной кислоты[2]
Хвостатое ядро интактное	Физиологический раствор	108±5
	3,0	175±8[3]
	6,0	210±15[3]
Хвостатое ядро, поврежденное каиновой кислотой	Физиологический раствор	160±13[3]
	3,0	232±21[4]
	6,0	320±18[4]

[1] D-АМЭА или физиологический раствор инъецировали унилатерально в интактное или поврежденное каиновой кислотой хвостатое ядро. Физиологический раствор инъецировали в контралатеральное хвостатое ядро. Каиновую кислоту инъецировали за 10 дней в правое хвостатое ядро крыс, получавших эквитезиновый наркоз в дозе 2 мкг в 1 мкл в течение 5 мин. Каждая точка представляет собой среднее значение по крайней мере 4 экспериментов±средняя ошибка.

[2] Содержание диоксифенилуксусной кислоты приведено относительно содержания в контрлатеральной стороне.

[3] $p < 0{,}01$ при сравнении с контрлатеральным хвостатым ядром.

[4] $p < 0{,}01$ при сравнении с гомолатеральным хвостатым ядром крыс, получивших инъекции физиологического раствора.

синтез дофамина в хвостатом ядре, в которое предварительно инъецировали каиновую кислоту. Как показано в табл. 7, инъекция D-Ala^2-мет-энкефалинамида (3—6 мкг) в хвостатое ядро, предварительно поврежденное каиновой кислотой, все же увеличивает содержание диоксифенилуксусной кислоты.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что участок действия энкефалинов при стимуляции синтеза дофамина в стриатуме расположен, по-видимому, в хвостатом ядре, поскольку этот эффект может быть вызван локальной инъекцией и ограничивается только инъецированной стороной. С другой стороны, способность интрастриарно инъецированного D-Ala^2-мет-энкефалинамида увеличивать синтез дофамина на фоне повреждения нейронов каиновой кислотой говорит о том, что для этого эффекта энкефалинов не существенны ни постсинаптические дофаминовые рецепторы, ни целостность стриато-нигральной петли обратной связи.

Принимая во внимание, что стриатум крысы является участком мозга, наиболее богатым опиатными рецепторами [24], что эти рецепторы связаны с синаптосомами [25] и что повреждение нигро-стриарного дофаминэргического пути 6-оксидофамином подавляет высокоаффинное связывание дигидроморфина в хвостатом ядре (Каренци и др., Шварц и др., данное издание), можно себе представить, что наркотические рецепторы, ответственные за вышеупомянутые эффекты, расположены пресинаптически на дофаминэргических нервных терминалях.

Было высказано предположение, что морфин и другие наркотические анальгезирующие средства вызывают каталепсию и увеличивают обновление дофамина благодаря нейролептикоподобным механизмам [23].

С тем чтобы проверить это предположение, мы решили установить, влияют ли опиоидные пептиды на дофаминэргическую передачу в базальном ганглии. Мы знаем теперь, что мет-энкефалин и в значительно большей степени D-Ala^2-мет-энкефалинамид при внутримозговом введении стимулируют синтез дофамина в стриатуме. Данный эффект обращается налоксоном, специфическим опиатным антагонистом, но сохраняется после разрушения дофаминовых рецепторов в стриатуме каиновой кислотой. Следовательно, можно предположить, что энкефалины стимулируют синтез дофамина, действуя на опиатные рецепторы, локализованные на дофаминэргических нервных терминалях. Как показано в табл. 6, внутрижелудочковая инъекция D-Ala^2-мет-энкефалинамида (1,5—6 мкг) индуцирует дозозависимое увеличение концентрацией метаболитов дофамина, гомованилиновой кислоты и диоксифенилуксусной кислоты в хвостатом ядре. Значительно более высокие дозы мет-энкефалина (50, 100 мкг) необходимы для увеличения содержания метаболитов дофамина (данные не приведены).

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют, по-видимому, о том, что стриато-мозжечковый тракт представляет собой главный стимулирующий вход на клетках Пуркинье и что лекарственные препараты, изменяющие содержание cGMP, действуют, возможно, модифицируя нервное проведение вдоль этого тракта.

Имеются данные о том, что дофамин, ацетилхолин, ГАМК и энкефалины являются возможными медиаторами в синапсах внутри стриарного комплекса. Однако остается еще идентифицировать нейромедиаторы в других синапсах, расположенных более дистально в различных участках среднего мозга.

Возможно, что одни и те же нейромедиаторы действуют в различных синапсах. В самом деле, ГАМК-эргическое проведение имеется по крайней мере и в мозжечке, и в стриарном комплексе. По этой причине введение мусцимола либо в мозжечок [10], либо в бледный шар оказывает одинаковое действие на содержание cGMP. Однако последний участок значительно более чувствителен к мусцимолу по сравнению с мозжечком. Возможно, что в стриарном комплексе ГАМК-эргическая система сосредоточена в более узкой области и в соответствии с этим более доступна для локально инъецированного препарата. Хотя имеются данные о том, что фактором, ответственным за торможение нейронов бледного шара, посылающих возбуждающие сигналы на лиановидные и мшистые волокна, является, по-видимому, ГАМК, природа возбуждающего медиатора для этих нейронов бледного шара неизвестна.

Существует предположение, что в механизмах, регулирующих содержание cGMP, роль дофамина состоит в том, что он включает холинэргическое возбуждающее действие на тормозные ГАМК-эргические нейроны, которые в свою очередь могут подавлять выход возбуждающего сигнала из бледного шара. И в этом случае природа возбуждающего медиатора для холинэргических интернейронов хвостатого ядра неизвестна.

Механизм действия энкефалинов на дофаминэргическую передачу и содержание cGMP требует дальнейших исследований. Неопубликованные результаты, полученные в нашей лаборатории, по-видимому, отвергают возможность того, что D-Ala^2-мет-энкефалинамид может подавлять дофаминэргическое проведение, либо воздействуя на дофаминовые рецепторы, либо подавляя высвобождение дофамина из дофаминэргических терминалей. Действительно мы, показали, что D-Ala^2-мет-энкефалинамид не подавляет чувствительную к дофамину аденилатциклазу в концентрациях вплоть до $5 \cdot 10^{-4}$ М. С другой стороны, апоморфин, введенный подкожно в дозах до 2 мг/кг, не способен предотвратить ни каталепсию, ни истощение cGMP в мозжечке, вызванные интрастриарной инъекцией D-Ala^2-мет-энкефалинамида. Приведенные результаты подтверждают предварительные данные, полученные одним из нас [21], о том, что при интрастиарном введении апоморфина снижение содержания cGMP в мозжечке, индуцированное системным введением морфина, не предотвращается, но апоморфин эффективно предотвращает истощение этого нуклеотида, индуцированное нейролептиками. Безусловно, необходима дополнительная информация для локализации участка действия D-Ala^2-мет-энкефалинамида в стриатуме, ответственного за каталепсию и снижение содержания cGMP. Имеющиеся в настоящее время данные дают основание думать, что такие опиатные рецепторы локализованы дистально относительно постсинаптических дофаминовых рецепторов в хвостатом ядре.

Список литературы

1. *Llinas R.* In: The Nervous System, ed. D. B. Tower, pp. 235—244, Raven Press, New York (1975).
2. *Allen G. I., Tsukahara N.* Physiol. Rev., **54**, 957—1006 (1974).
3. *Biggio G., Guidotti A.* Brain Res., **107**, 365—373 (1976).
4. *Guidotti A., Biggio G., Costa E.* Brain Res., **96**, 201—205 (1975).
5. *Mao C. C., Guidotti A., Costa E.* Brain Res., **79**, 510—514 (1974).
6. *Mao C. C., Guidotti A., Costa E.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak., 289, 369—378 (1975).
7. *Costa E., Guidotti A., Mao C. C., Suria A.* Life Sci., **17**, 167—186 (1975).
8. *Naik S. R., Guidotti A., Costa E.* Neuropharmacology, **15**, 479—484 (1976).
9. *Mao C. C., Guidotti A., Costa E.* Mol. Pharmacol., **10**, 736—745 (1974).

10. *Biggio G., Brodie B. B., Costa E., Guidotti A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 3592—3596 (1977).
11. *Biggio G., Guidotti A.* Nature, **265**, 240—242 (1977).
12. *Biggio G., Costa E., Guidotti A.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **200**, 207—215 (1977).
13. *Fox M., Williams T. D.* Brain Res., **20**, 140—144 (1970).
14. *McGeer E. G., Innanen V. T., McGeer P. L.* Brain Res., **118**, 356—358 (1976).
15. *Schwarcz R., Coyle J. T.* Brain Res., **127**, 235—249 (1977).
16. *Pellegrino L., Cushman A. J.* In: Stereotaxic Atlas of the rat brain (Appleton Century Crofts), New York (1967).
17. *Di Chiara G., Porceddu M. L., Fratta W., Gessa G. L.* Nature, **267**, 270—272 (1977).
18. *Trabucchi M., Cheney D., Racagni G., Costa E.* Nature, **249**, 664—666 (1974).
19. *Biggio G., Costa E., Guidotti A.* In: Advances in Biochemical Psychopharmacology, eds. E. Costa, E. Giacobini and R. Paoletti, **15**, 325—335 (1976).
20. *Krogsgaard-Larsen P., Johnston G. A. R., Curtis D. R., Game C. J. A., McCulloch R. M.* J. Neurochem., **25**, 803—809 (1975).
21. *Biggio G., Guidotti A., Costa E.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac., **296**, 117—121 (1977).
22. *Pert C. B., Pert A., Chang J. K., Fong B. T. W.* Science, **194**, 330—332 (1976).
23. *Sasame H. A., Perez-Cruet J., Di Chiara G., Tagliamonte A., Tagliamonte P., Gessa G. L.* J. Neurochem., **19**, 1953—1957 (1972).
24. *Pert C. B., Snyder S. H.* Science, **179**, 1011—1014 (1973).
25. *Terenius L.* Acta Pharmac. Tox., **32**, 317—322 (1973).
26. *Walters J. R., Roth R. H., Aghajanian G. K.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **186**, 630—639 (1973).

ЭНДОРФИНЫ И РЕЦЕ
СВЯЗЬ С ДОФА

Ж. ШВАРЦ, А. ПОЛ
С. ГРОС,

(J. C. Schwartz, H. Po
Ph

Имеется много основ
их рецепторов и их действ
аминэргической системой,
эффектов наркотических а
Многие наблюдения,
ные, все же позволяют п
активность нигро-стриарн
вопросу посвящен ряд обз
вещества вызывают гипок
причем эти эффекты легк
ми. Другие эффекты, напо
ем нейролептических сре
эргической передачи и мо
ре в некоторой степени,
[7, 34] (Биггио и др., да
анальгезирующих препар
дофамина в стриатуме [
по-видимому, при внутри
и др., данное издание).
симптомы синдрома опио
дофаминэргической систе
дофаминовых агонистов
ратами; помимо этого, н
при хроническом или суб
витие состояния повыше
агонистам или пониженно
гонистам [40].
Представление об уч
тума в остром и хрониче
лученными недавно данн
более обогащена как опи
энкефалинами [33, 58, 5
иммуногистохимических

ЭНДОРФИНЫ И РЕЦЕПТОРЫ ЭНДОРФИНОВ В СТРИАТУМЕ, СВЯЗЬ С ДОФАМИНЭРГИЧЕСКИМИ НЕЙРОНАМИ

Ж. ШВАРЦ, А. ПОЛЛАРД, С. ЛЛОРАН, Б. МАЛЬФРОЙ,
С. ГРОС, Ф. ПРАДЕЛЬС, Ф. ДРАЙ

(J. C. Schwartz, H. Pollard, C. L. Llorens, B. Malfroy, C. Gros,
Ph. Pradelles, F. Dray)

Имеется много оснований полагать, что анализ эндорфинов, их рецепторов и их действия в стриатуме, особенно в связи с дофаминэргической системой, может привести к выяснению сложных эффектов наркотических анальгезирующих средств.

Многие наблюдения, хотя в ряде случаев и не до конца понятные, все же позволяют предположить, что эти агенты влияют на активность нигро-стриарной дофаминэргической системы (этому вопросу посвящен ряд обзоров [20, 39, 40]). У крыс, например, эти вещества вызывают гипокинезию, кататонию и ригидность мышц, причем эти эффекты легко подавляются дофаминовыми агонистами. Другие эффекты, напоминающие эффекты, вызванные введением нейролептических средств, указывают на снижение дофаминэргической передачи и могут быть воспроизведены, по крайней мере в некоторой степени, внутримозговым введением эндорфинов [7, 34] (Биггио и др., данное издание). Введение наркотических анальгезирующих препаратов в остром опыте стимулирует обмен дофамина в стриатуме [24, 12], и этот эффект воспроизводится, по-видимому, при внутримозговом введении эндорфинов (Биггио и др., данное издание). С другой стороны, некоторые типичные симптомы синдрома опиоидной абстиненции протекают с участием дофаминэргической системы: они воспроизводятся при введении дофаминовых агонистов и блокируются нейролептическими препаратами; помимо этого, наркотические анальгезирующие средства при хроническом или субхроническом применении индуцируют развитие состояния повышенной чувствительности к дофаминовым агонистам или пониженной чувствительности к дофаминовым антагонистам [40].

Представление об участии дофаминэргической системы стриатума в остром и хроническом действии опиатов подтвердилось полученными недавно данными о том, что эта структура мозга наиболее обогащена как опиатными рецепторами [38, 28, 57], так и энкефалинами [33, 58, 56]. Более того, визуализация с помощью иммуногистохимических методов энкефалинсодержащих нервных терминалей и тел нейронов в стриатуме крыс [21, 30] подтвердила точку зрения о взаимодействии предполагаемых энкефалинэргических нейронов с нигро-стриарной дофаминэргической системой.

Следовательно, изучение этого взаимодействия приобретает эвристическую ценность для понимания как острого, так и длительного действия опиатов и функциональной роли опиоидных пептидов. С этой целью мы разработали методологию анализа эндорфиновых рецепторов и оценки равновесного содержания различных эндорфинов в мозгу. В настоящей статье мы приводим данные о влиянии различных химических и механических повреждений на эти параметры. На основе интерпретации этих данных предлагается модель взаимодействия, описывающая острое и хроническое воздействие опиатов на дофаминэргическую систему в стриатуме.

Характер и распределение участков связывания ^{3}H-лей-энкефалина в стриатуме

Еще до открытия эндогенных опиоидных пептидов характер и распределение мест связывания этих веществ в тканях мозга изучали, используя в качестве лигандов высокомеченые опиатные агонисты и антагонисты. Поскольку эти места связывания, вероятно, более адаптированы к узнаванию эндорфинов, чем экзогенных опиоидных соединений, мы выбрали в качестве лиганда для наших исследований ^{3}H-лей-энкефалин. Мы соблюдали две предосторожности, позволившие избежать быстрой деградации этого пептида в экстрактах мозга [46]. Во-первых, почти полностью предотвращали гидролиз лей-энкефалина. Для этого тщательно промывали фракцию субклеточных частиц (в целом соответствующую лизированной субклеточной фракции P_2), используемую для экспериментов по связыванию, поскольку подавляющая часть пептидазной активности локализовалась в надосадочной фракции. И во-вторых, предотвращали малую остаточную деградацию, добавляя 25 мкМ бацитрацина, ингибитора пептидазной активности [19]. О том, что деградации ^{3}H-лей-энкефалина в ходе инкубации не происходит, судили по одинаковым значениям связывания, полученным при различной продолжительности инкубации; в присутствии небольших количеств надосадочной фракции связывание снижалось. Это подтверждалось также радиохроматографией инкубируемого материала, выявляющей присутствие гомогенного материала, соответствующего аутентичному ^{3}H-лей-энкефалину.

Связывание ^{3}H-лей-энкефалина с мембранами стриатума, прослеживаемое в этих условиях, в типичном случае характеризовалось наличием двух компонентов, одного насыщаемого и одного ненасыщаемого (рис. 1). Ненасыщаемый компонент можно оценить, либо проведя из точки начала координат линию, параллель-

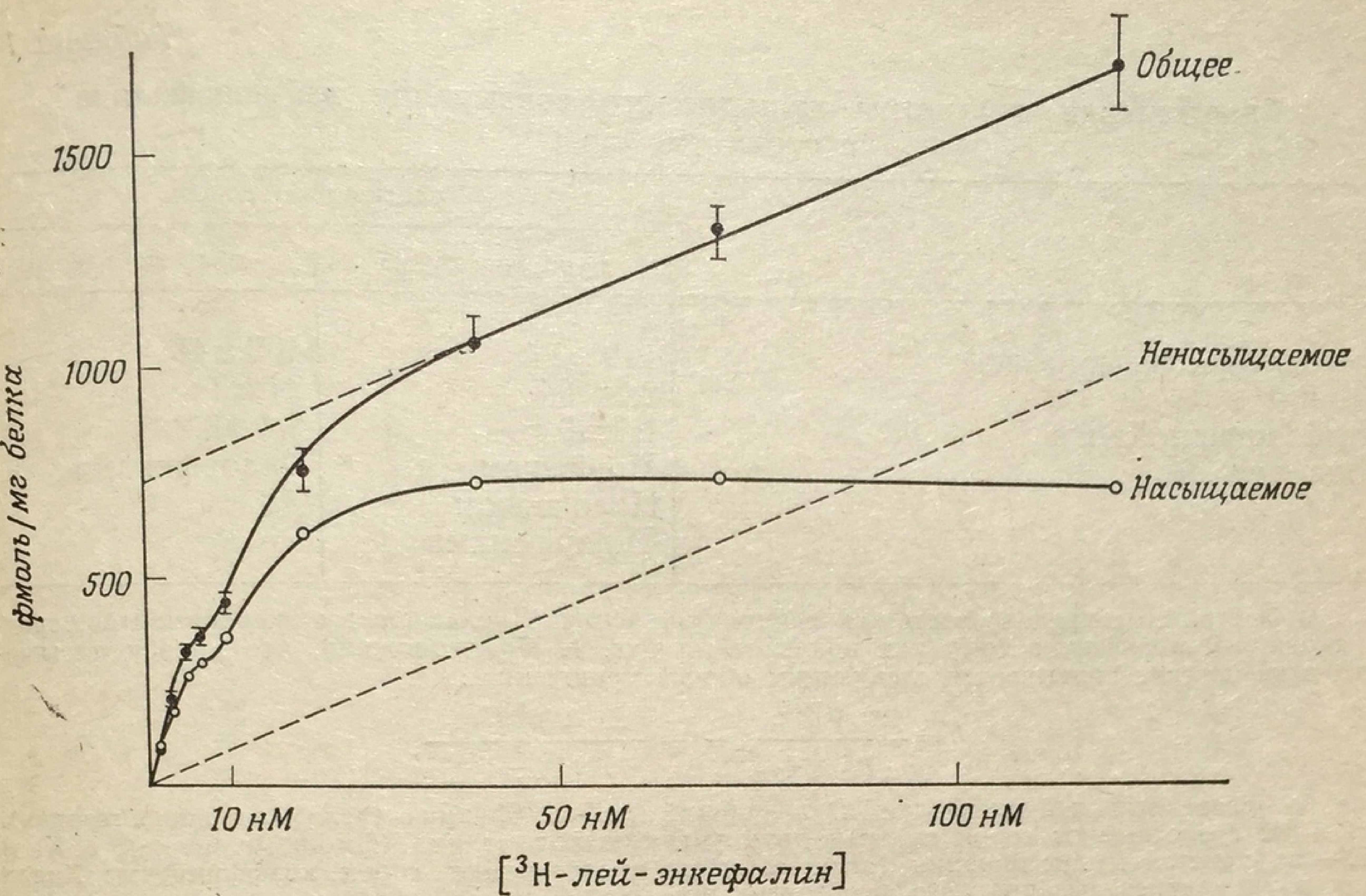


Рис. 1. Связывание ^{3}H-лей-энкефалина с мембранами стриатума. Самцов крыс обезглавливали и их стриатум быстро гомогенизировали в 20 объемах *трис*-буфера (0,05 М, pH 7,4). Осадок, образующийся после двух этапов центрифугирования (180 g, 5 мин; 1000 g, 20 мин), предварительно инкубировали 15 мин при 30 °C фракциями по 100 мкл, каждая из которых содержала около 150 мкг белка. Инкубацию (15 мин в присутствии 20 мкМ бацитрацина) останавливали добавлением 3 мл холодного буфера. После фильтрации под вакуумом определяли радиоактивность с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра. Каждая точка представляет собой среднее значение трех определений ± средняя ошибка.

ную спрямленной части кривой общего связывания, либо измерив связывание в присутствии 5 мкМ нерадиоактивного лей-энкефалина. Что касается насыщаемого компонента, то кинетика насыщения в состоянии равновесия не может быть описана простым взаимодействием с одним классом мест связывания, как это следует из наличия небольшого плато, соответствующего примерно 5 нм лей-энкефалина на рис. 1, и подтверждается графиками Скэтчарда или Лайнуивера — Берка. Эти представления, однако, оказались непригодными для описания кинетики с помощью этой кривой. И лишь применение метода итераций позволило нам правильно охарактеризовать два класса мест связывания (табл. 1). Места связывания, относящиеся к первому классу, характеризуются высоким сродством ($K_D = 2,7$ нМ), подчиняются кинетике Михаэлиса (коэффициент Хилла не отличается существенно от 1) и узнаются помимо эндорфинов также морфином и налоксоном [5, 6]. Можно заключить, следовательно, что они представляют собой «опиатные» рецепторы, определенные ранее в исследовани-

Таблица 1

Кинетические параметры насыщаемого связывания лей-энкефалина в стриатуме крыс[1]

	Участки связывания	
	первого класса	второго класса
Емкость (фмоль/мг белка)	179 ± 17	465 ± 48
K_D, нМ	$2{,}7 \pm 0{,}5$	24 ± 3
Коэффициент Хилла	$1{,}1 \pm 0{,}1$	$2{,}4 \pm 0{,}2$
Узнаются	Морфином Налоксоном Эндорфинами	Эндорфинами

[1] Эти данные представлены как средние значения 8 независимых экспериментов±средняя ошибка, аналогично тому как показано на рис. 1. Предположено, что кривая насыщения в равновесии описывается следующим общим уравнением:

$$b = \frac{V1t^{n1}}{K1^{n1} + t^{n1}} + \frac{V2t^{n2}}{K2^{n2} + t^{n2}},$$

где b — связанный лей-энкефалин и t — общий лей-энкефалин (исходная концентрация). $V1$ и $V2$ представляют собой емкости двух участков связывания (фмоль/мг белка), а $K1$ и $K2$ — их константы диссоциации (нМ). $n1$ и $n2$ представляют собой коэффициенты Хилла для двух мест связывания. Эти параметры определяли в соответствии с методом, предложенным Паркером и Вудом [48], используя метод наименьших квадратов, разложение Тэйлора и итеративные вычисления.

ях связывания, проводимых с меченными ^{3}H опиатными агонистами или антагонистами.

С другой стороны, места связывания, относящиеся ко второму классу, составляют около 72% общего числа мест связывания ^{3}H-лей-энкефалина, характеризуются несколько пониженным сродством к лей-энкефалину ($K_D = 23{,}6$ нМ) и при связывании пептидов обнаруживают кажущуюся положительную кооперативность (на что указывает значение коэффициента Хилла, равного приблизительно 2), которая и вызывает появление плато на рис. 1. Интересно, что места связывания второго класса не узнаются в отличие от опиатных рецепторов ни морфином, ни налоксоном.

Функциональная роль мест связывания, относящихся к первому классу, полностью доказана многочисленными исследованиями, в которых была обнаружена хорошая корреляция между опиатоподобной активностью в различных биологических системах и сродством к большому классу синтетических и эндогенных соединений. Возможную роль мест связывания второго класса остается еще выяснить. Следует, однако, отметить, что, согласно нашим данным, оба класса мест связывания проявляют четко выраженный параллелизм в региональном и субклеточном распределении в мозгу крыс и мышей (в печати).

Для исследования возможной топографической связи опиатных рецепторов с дофаминэргическими синапсами мы определяли количество мест связывания ^{3}H-лей-энкефалина, относящихся к первому классу, в последовательных фронтальных срезах стриатума крыс (рис. 2). Оказалось, что плотность этих участков регуляр-

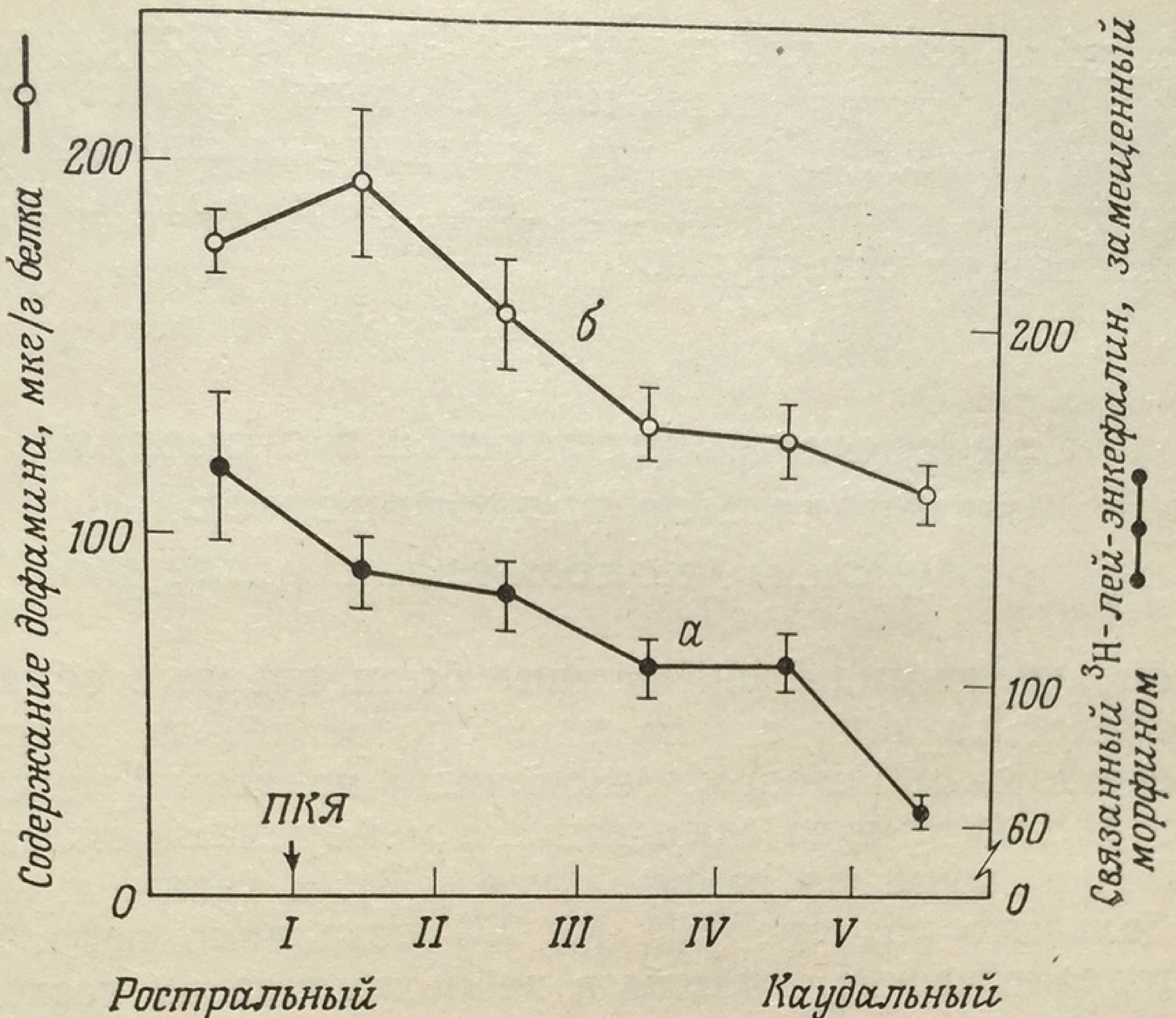


Рис. 2. Распределение участков связывания ^3H-лей-энкефалина *(а)* (замещаемого морфином) и участков, содержащих дофамин *(б)* в фронтальных срезах стриатума крысы. Сечения стриатума проводили по Гловински и Иверсену [25] на охлажденной пластинке и получали шесть серийных срезов. Первый разрез проводился на уровне передней спайки, в результате чего срез I содержал участок аккумбентного ядра (помимо ткани стриатума). Остальную часть стриатума разделяли затем на пять параллельных срезов равной толщины.

Гомологичные срезы от 4 животных объединяли и гомогенизировали в 20 объемах холодного *трис*-буфера (50 мМ, pH 7,4). Аликвоты гомогенатов быстро отбирали и депротеинизировали $HClO_4$ для определения содержания дофамина [42].

Связывание ^3H-лей-энкефалина определяли во фракции частиц гомогената, полученной путем двух последовательных этапов центрифугирования (180 g, 5 мин и затем 10 000 g, 20 мин). Инкубацию в течение 15 мин при 30 °C с 20 мкМ бацитрацином проводили в присутствии только 12 нМ ^3H-лей-энкефалина (45,6 Ки/ммоль, Radiochemical Center, Amersham) либо пептида в сочетании с 5 мкМ морфином. Связывание ^3H-лей-энкефалина выражали как фмоль/мг белка и оценивали только связывание, подавляемое морфином, т. е. связывание с рецепторами первого типа. Каждая точка представляет собой среднее значение пяти отдельных экспериментов ± средняя ошибка. Для определения ^3H-лей-энкефалина использовали три пробы, а для определения дофамина — две пробы. (Перепечатано с разрешения Nature. 1977, **268**, 745.)

но снижается от ростральной к каудальной части стриатума, причем плотности мест связывания в первом и последнем срезах различаются в два раза. Параллельные в основном изменения обнаруживаются и в содержании дофамина. Как показали Тассен и др. [59], такие же топографические изменения обнаруживаются для захвата ^3H-дофамина и для стимулируемой дофамином аденилатциклазы; по-видимому, эти изменения отражают гетерогенное распределение дофаминэргических нервных терминалей внутри стриатума. Наши наблюдения, таким образом, согласуются с представлением, подтверждаемым большим количеством экспериментальных данных, о том, что опиатные рецепторы могут быть каким-то путем топографически связаны с дофаминэргическими синапсами внутри стриатума.

Содержание эндорфинов в стриатуме, определяемое радиорецепторным и радиоиммунологичским методами

Опиоидные пептиды энкефалины были впервые обнаружены в мозгу млекопитающих с помощью биологических тестов [32] и радиорецепторным методом, основанным на конкуренции этих веществ с ^{3}H-опиатами за связывание с мембранами мозга [49, 61]. Определение структуры энкефалинов [33], а также других эндорфинов большего размера [62, 15, 27] позволило разработать новые методологические подходы в нейрохимических исследованиях. Мы разработали недавно методы радиоиммунологического определения мет- и лей-энкефалина, а также радиорецепторный метод, основанный на конкуренции с ^{3}H-лей-энкефалином за связывание с мембранами стриатума крысы: нам представляется интересным сравнить значения, полученные в одних и тех же экстрактах мозга двумя методами, характеризующимися различной специфичностью по отношению к разным опиоидным пептидам.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Вследствие малого размера энкефалинов их конъюгировали с овальбумином для индукции выработки антител у кроликов. Специфичность полученных таким образом антисывороток может быть продемонстрирована по отсутствию перекрестной реактивности антител к метэнкефалину (рис. 3) или лей-энкефалину [26] с большим количеством фрагментов «родительских» молекул; очень важно быть уверенным в том, что продукты деградации энкефалинов [46] не мешают определению. Отсутствие перекрестной реактивности с Tyr-Gly-Gly-(D)Phe-Met, третичная структура которого заметно отличается от таковой мет-энкефалина (Роквес и др., личное сообщение), показывает, что часть молекулы, включающая в себя остаток фенилаланина, участвует в узнавании антисывороткой, а также опиатными рецепторами [16]. Специфичность антисыворотки к энкефалинам обусловлена, по-видимому, тем, что пептиды сохраняют свою конформацию, даже будучи конъюгированными с носителями антигенов, поскольку конъюгация обеспечивается участками молекулы, не участвующими в образовании стабильной третичной конформации [52, 53]. Обнаруживается значительная перекрестная реактивность между антисыворотками к мет- и лей-энкефалинам (7 и 5% соответственно), которая должна быть скорректирована при определении и которая, по-видимому, может быть обусловлена сходством стабильных конформаций двух энкефалинов, обнаруженным методом ядерного магнитного резонанса профессором Роквесом и его сотрудниками.

Использование ^{125}I-индикаторов (были выбраны моноиодированные производные, более стабильные по сравнению с дииодированными производными) позволило достигнуть удовлетворительной чувствительности радиоиммунологического метода, которая на один-два порядка превышает чувствительность радиоиммуноло-

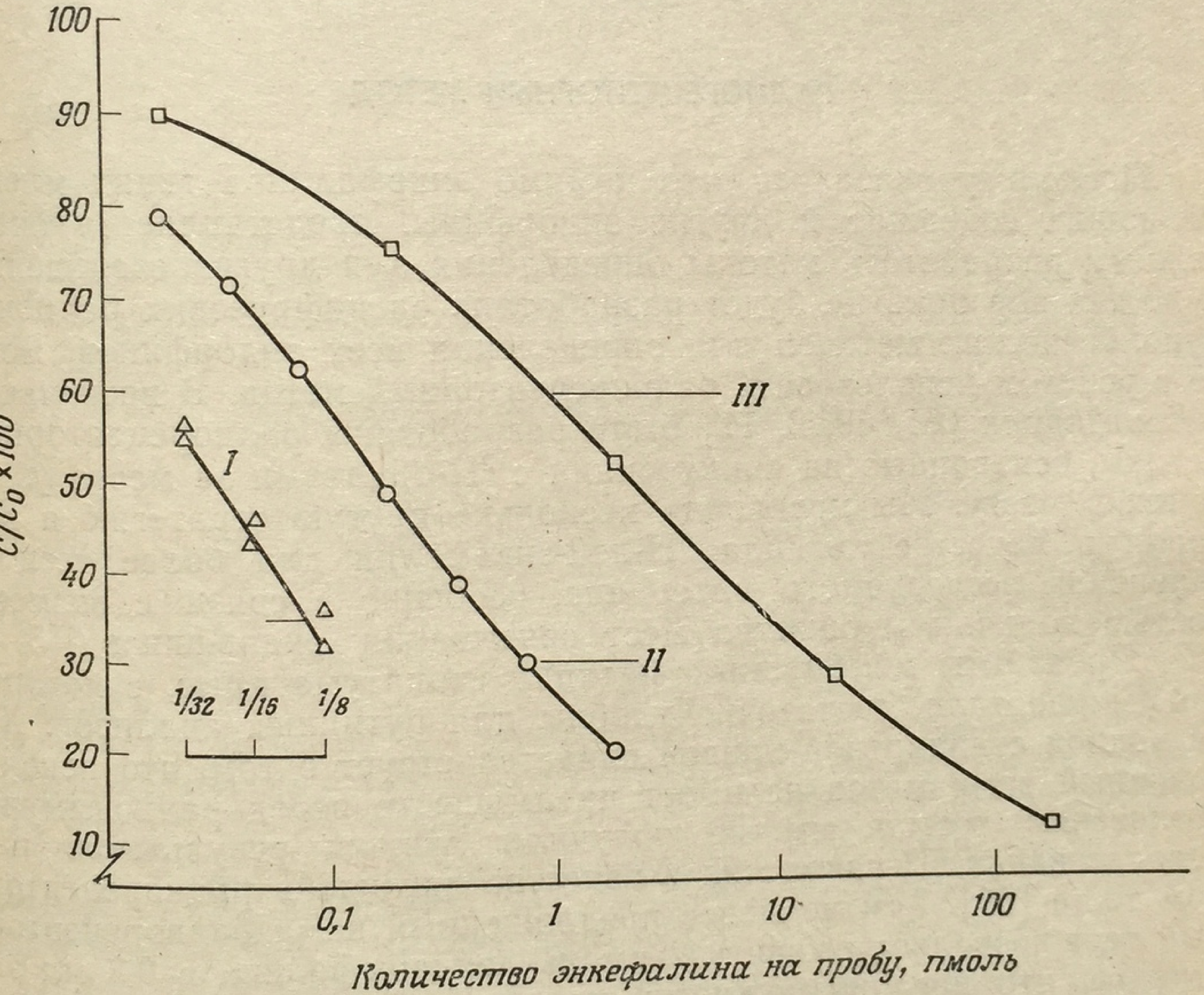


Рис. 3. Радиоиммунологический тест на мет-энкефалин: подавление связывания ^{125}I-мет-энкефалина с антисывороткой в присутствии возрастающих концентраций мет-энкефалина *(II)*, лей-энкефалина *(III)* или экстракта стриатума *I*. Антитела получали от кроликов, иммунизированных мет-энкефалином, конъюгированным с овальбумином с помощью карбодиимида. Радиоиммунологический тест по конкуренции с 10 пМ ^{125}I-мет-энкефалином. Инкубацию проводили при 4 °C в течение 18 ч, после чего связанную фракцию осаждали в присутствии полиэтиленгликоля (конечная концентрация 20%) и гамма-глобулина (конечная концентрация 0,05%). Получили следующие значения IC_{50} для различных пептидов: 0,5 нМ для мет-энкефалина, 7,1 нМ для лей-энкефалина (7% перекрестной реактивности) и 0,5 мкМ для β-эндорфина, α-эндорфина, Tyr-Met, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Tyr-Gly-Gly-Phe, Gly-Phe-Met, Gly-Gly-Phe-Met, Tyr-Gly-Gly-(D)Phe-Met.

гических методов, разработанных в других лабораториях [56, 63]. Значения IC_{50} для немеченых пептидов составляют 0,57 нМ и 0,55 нМ для мет- и лей-энкефалина в соответствующих радиоиммунологических методах их определения, что позволяет использовать высокие разведения экстрактов тканей. Так, например, экстракт стриатума (50 мг ткани в 1 мл) в обоих радиоиммунологических тестах может быть разведен в соотношении 1/32.

И в заключение: хорошая параллельность спрямленного участка стандартной кривой и прямой линии, получаемой при нескольких разведениях экстрактов мозга (для примера см. рис. 3) показывает, что в этих тканях антисыворотка специфически узнает эндогенные энкефалины.

РАДИОРЕЦЕПТОРНЫЙ МЕТОД

Поскольку оказалось, что помимо энкефалинов ткани млекопитающих содержат и другие эндорфины, представляется очень важным разработать методы определения для других соединений. А до тех пор пока не будет разработано специфических радиоиммунологических методов для определения всех эндорфинов, можно с успехом использовать радиорецепторный метод. В нескольких лабораториях [61, 49, 2, 11] были разработаны радиорецепторные методы, основанные на конкуренции с ^{3}H-опиатами за места узнавания в мозгу. Мы предпочли несколько другую стратегию и выбрали в качестве лиганда ^{3}H-лей-энкефалин для более тесного сравнения исследуемого материала, особенно в связи с возможностью наличия множества мест связывания эндорфинов [5, 6, 45]. Препараты мембранных фракций стриатума крыс, с которыми мы работали, достаточно удобны для рутинных анализов. Хотя наклон стандартной кривой свидетельствует о том, что использованный нами метод не имеет преимуществ перед радиоиммунологическим тестом, мы не получили лучших результатов при использовании ^{3}H-налоксона в качестве лиганда в радиорецепторном тесте [56]. Тем не менее предложенный нами радиорецепторный тест позволяет выявить 2 пмоль лей-энкефалина в 0,2 мл экстракта, что дает возможность надежно определять содержание эндорфинов в различных участках мозга. При определении способности различных опиоидных пептидов к замещению меченого лиганда в радиорецепторном тесте обнаруживаются большие различия (см. подпись к рис. 4). В связи с этим следует подчеркнуть, что, хотя мы выражаем полученные результаты в нмолях «эквивалентов лей-энкефалина», эти результаты представляют лишь приближенную оценку: для уточнения требуется знать относительное содержание всех пептидов, создающих «замещающую активность» тканевых экстрактов, подвергнутых радиорецепторному анализу.

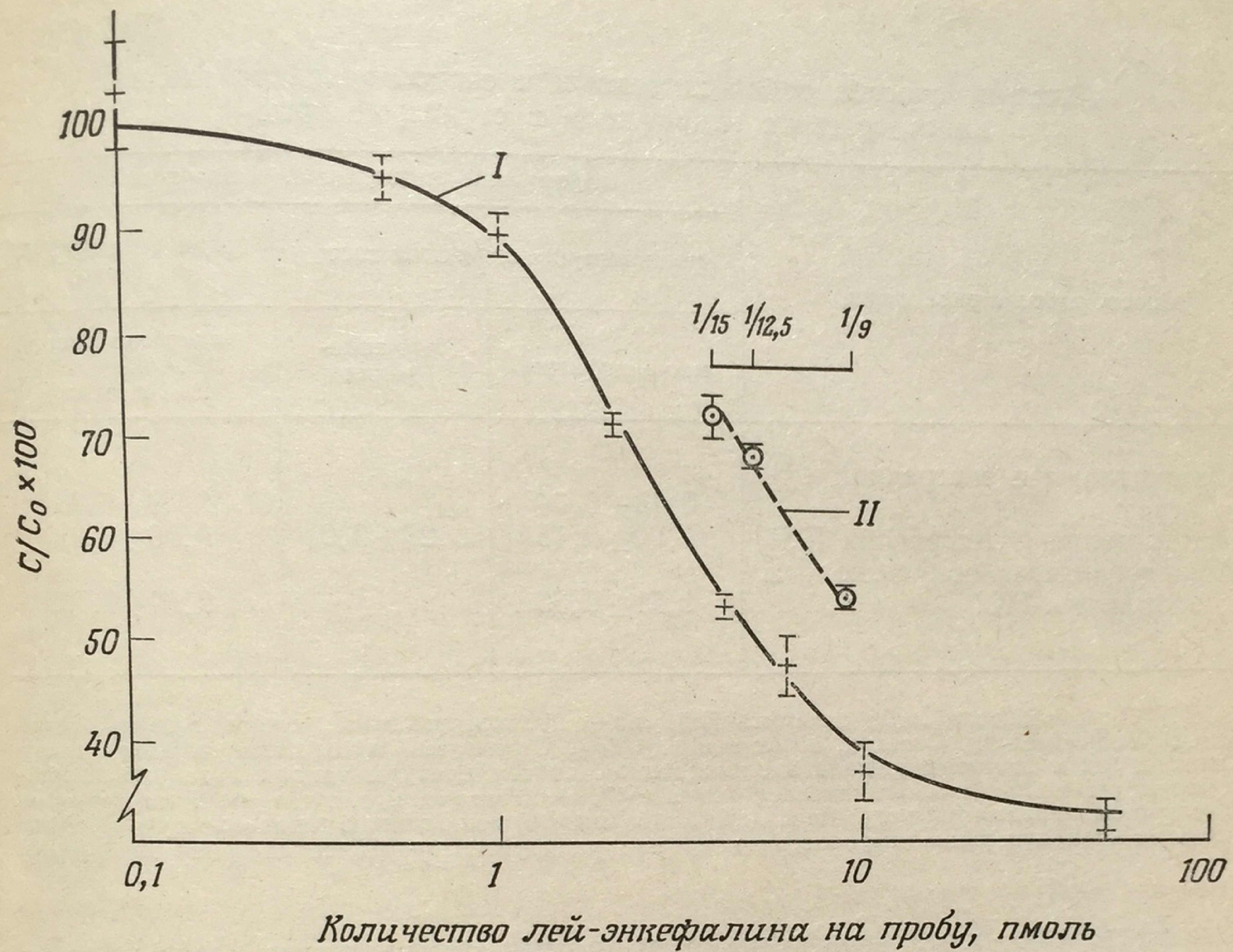


Рис. 4. Радиорецепторный тест: подавление связывания ^{3}H-лей-энкефалина с мембранами стриатума крысы возрастающими концентрациями лей-энкефалина (*I*) или экстракта стриатума (*II*). Мембраны стриатума получены, как описано в подписи к рис. 1. 0,1 мг белка этого препарата инкубировали при 30 °C в течение 15 мин в присутствии 20 мкМ бацитрацина, 5 нМ ^{3}H-лей-энкефалина и различных концентраций лей-энкефалина или экстракта ткани. Реакцию останавливали добавлением 3 мл ледяного 0,05 М *трис*-буфера, немедленно фильтровали через фильтр Ватман из стекловолокна и определяли задерживающуюся на фильтре радиоактивность. Исходя из стандартных кривых, полученных с различными опиоидными пептидами, можно получить следующие значения относительной активности, т. е. отношения молярных концентраций, вызывающих равное вытеснение меченого лиганда: лей-энкефалин — 1,00; мет-энкефалин — 1,50; α-эндорфин — 0,23; β-эндорфин — 0,80. Не обнаружено достоверного вытеснения в присутствии 10 мкМ Tyr-Gly или Tyr-Gly-Gly.

ОЦЕНКА СПОСОБОВ ЗАБОЯ ЖИВОТНЫХ И МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ТКАНЕЙ

Как уже было показано, энкефалины чрезвычайно чувствительны к деградации протеазами [33, 63, 28], что требует тщательного выбора подходящих условий при изготовлении тканевых экстрактов для радиоиммунологического или радиорецепторного анализа.

В табл. 2 приведены результаты экспериментов, иллюстрирующие эту точку зрения. Интерпретируя эти результаты, можно

Таблица 2

Влияние способа забоя животных и экстрагирования ткани на содержание эндорфинов в стриатуме крыс[1]

Способ забоя и экстракции	Содержание эндорфинов, нмоль/г ткани		
	радиоиммунологический тест		радиорецепторный тест
	мет-энкефалин	лей-энкефалин	эндорфины, нмоль лей-энкефалина на 1 г ткани
Декапитация и экстракция буфером	0,14±0,04		2,38±0,68
Декапитация и экстракция HCl	1,20±0,15	0,27±0,03	9,76±0,81
Микроволновое облучение и экстракция HCl	1,51±0,33		9,42±0,73

[1] Крыс забивали либо декапитацией, либо сфокусированным микроволновым облучением (Medical Engin. Consult., LMM model, USA). Стриатумы немедленно вырезали, погружали в лед и гомогенизировали в охлажденном до температуры таяния льда 0,05 М *трис*-буфере, pH 7,4, либо в охлажденной 0,1 н. HCl. Аликвоты гомогенатов в 0,3 мл депротеинизировали тепловой денатурацией (95 °С, 15 мин) и осветленную надосадочную фракцию использовали для радиоиммунологического или радиорецепторного определения эндорфинов.

сказать, что резко сниженные значения содержания мет-энкефалина и общих эндорфинов (радиорецепторный анализ), полученные, когда животных забивали декапитацией, а экстракты готовили гомогенизацией ткани в буфере, обусловлены деградацией, происходящей на стадии гомогенизации.

Предположение о быстрой деградации эндорфинов при гомогенизации в буфере за тот промежуток времени, который проходит между гомогенизацией и тепловой депротеинизацией (менее 1 мин), подтверждается экспериментом, в котором ^{3}H-лей-энкефалин добавлялся к такому гомогенату за несколько секунд до депротеинизации: в этом случае на радиохроматограммах (тонкослойная хроматография в системе бутанол: $CH_3COOH : H_2O$, 4 : 1 : 1) помимо аутентичного ^{3}H-лей-энкефалина появляется второй компонент; наоборот, при добавлении ^{3}H-лей-энкефалина к материалу, гомогенизированному в 0,1 н. HCl, деградация предотвращается [26]. В связи с этим можно заключить, что гомогенизация в буфере приводит к соединению друг с другом эндогенных пептидов и активных пептидаз, которые в противном случае локализованы in situ в различных компартментах. Деградация предотвращается, когда объединение пептидов и пептидаз происходит при очень низких pH или после инактивации пептидаз (микроволновое облучение). Мы выбрали первые условия (т. е. забой путем декапитации и гомогенизация в 0,1 н. HCl с последующей тепловой депротеинизацией) как наиболее подходящие для определения содержания эндорфинов в стриатуме и других участках мозга.

СРАВНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОРФИНОВ, ОПРЕДЕЛЯЕМОГО РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИМ И РАДИОРЕЦЕПТОРНЫМ МЕТОДАМИ

Содержание мет- и лей-энкефалина в стриатуме крыс хорошо соответствует результатам Янга и др. [63], использовавших радиоиммунологический тест, и находится в тех же пределах, что и значения, полученные Смитом и др. [58] при определении содержания энкефалинов у морских свинок с помощью биологического теста. Это в равной мере относится и к содержанию энкефалинов в других участках мозга (обнаруживающего большую гетерогенность, несколько коррелирующую с гетерогенностью в связывании ^3H-лей-энкефалина [43]). Неравномерное распределение энкефалинов отмечено также Симантовым и Снайдером [56], но полученные ими значения оказываются на один-два порядка ниже, чем наши, — по-видимому, в связи с тем, что эти авторы не предприняли необходимых предосторожностей для предотвращения деградации пептидов.

Общее содержание эндорфинов в стриатуме (выраженное в эквивалентах лей-энкефалина) оказалось значительно выше, чем суммарное содержание мет- и лей-энкефалина. То же самое наблюдалось и в других участках мозга: например, в гипоталамусе отношение общего содержания эндорфинов (определенного радиорецепторным методом) к сумме концентраций двух энкефалинов равно 16 (для сравнения: в стриатуме это значение равно 8). Чем можно объяснить такие большие различия? Даже принимая во внимание более высокое содержание в тканях мет-энкефалина, соединения с более высокой активностью в радиорецепторном тесте, чем лей-энкефалин, не удается полностью сгладить различия между результатами определений радиорецепторным и радиоиммунологическим методами. Объяснить это можно, по-видимому, тем, что при радиорецепторном анализе экстрактов мозга происходит узнавание каких-то веществ, отличных от энкефалинов. Некоторые из этих веществ скорее всего являются настоящими эндорфинами, т. е. пептидами с опиатоподобной активностью, поскольку ряд исследователей, используя радиоиммунохимический тест, выявили в некоторых участках β-эндорфин [2] (а также Блюм и др., данное издание). Эти данные согласуются с недавним сообщением Чёнга и др. [11] о том, что при хроматографии экстракта цельного мозга мыши на колонке с сефадексом G-25 обнаруживается три пика эндорфинов (радиорецепторное определение), размеры которых примерно соответствуют таковым α-эндорфина, β-эндорфина и энкефалинов соответственно.

Следует еще раз подчеркнуть, что оценки, полученные при радиорецепторном анализе, являются весьма приблизительными и что на результаты, полученные при использовании этого метода, могут оказывать влияние эндогенные неморфиномиметические вещества.

Локализация эндорфинов и эндорфиновых рецепторов в стриатуме, выявляемая по эффектам избирательных повреждений

Возможность того, что участки связывания энкефалинов локализованы на самих дофаминэргических нейронах нигро-стриарного тракта, была исследована прямо путем оценки эффектов различных типов повреждений, приводящих к деструкции части этих нейронов. После химического повреждения, вызванного 6-оксидофамином, введенным либо в желудочек, либо путем медленной инфузии в substantia nigra в соответствии со строгими условиями Агида и др. [1], наблюдается избирательная дегенерация дофаминэргических нейронов и достоверное снижение связывания ^{3}H-лей-энкефалина со своими высокоаффинными местами связывания (табл. 3 и 4). Такой же эффект наблюдается и в том случае, когда дегенерация дофаминэргических терминалей (оцениваемая по снижению захвата ^{3}H-дофамина или активности ДОФА-декарбоксилазы) вызвана электрокоагуляцией компактной части substantantia nigra или перерезкой нигро-стриарного пучка на уровне гипоталамуса (табл. 4).

Следует упомянуть некоторые особенности этого процесса, поскольку они проливают кое-какой свет на механизм, участвующий в этом снижении. Снижение связывания ^{3}H-лей-энкефалина со своими высокоаффинными рецепторами обусловлено изменением максимального связывания без заметного изменения значения K_D [51]; следовательно, это снижение отражает, по-видимому, снижение количества рецепторных мест без изменения их связывающих свойств. Кроме того, снижение затрагивает не только первый класс мест связывания ^{3}H-лей-энкефалина, но также и связывание ^{3}H-налоксона и второй класс мест связывания ^{3}H-лей-энкефалина,

Таблица 3

Снижение связывания ^{3}H-лей-энкефалина в стриатуме крыс после введения 6-оксидофамина в substantia nigra[1]

	Связывание ^{3}H-лей-энкефалина, фмоль/мг белка	Захват, фмоль/(мг белка·5 мин)	
		^{3}H-дофамин	^{3}H-холин
Контрольная сторона	178±3	2320±240	72±11
Поврежденная сторона	133±4	140±40	74±12
Разница	—29±3%[2]	—94±1%[2]	—

[1] Унилатеральная инъекция 6-оксидофамина (4 мкл раствора с концентрацией 3 мг/мл) проводилась по методу Агида и др. [1]. Крыс забивали спустя 9—15 дней. Стриатум гомогенизировали в 20 объемах 0,32 М сахарозы и аликвоты одного и того же гомогената использовали для оценки связывания и захвата. Связывание ^{3}H-лей-энкефалина с рецепторами первого класса определяли, как описано в подписи к рис. 2. Захват определяли в присутствии 20 нМ ^{3}H-дофамина или ^{3}H-холина соответственно. Среднее значение 7 экспериментов±средняя ошибка (по 3 пробы на каждое определение).

[2] $p < 0{,}001$.

Таблица 4

Снижение связывания ^{3}Н-лей-энкефалина и ^{3}Н-налоксона в стриатуме крыс после различных типов повреждения[1)]

Тип повреждения	Связывание ^{3}Н-лей-энкефалина		Связывание ^{3}Н-налоксона	ДОФА-декарбоксилаза
	1-й класс	2-й класс		
Введение 6-оксидофамина в желудочек мозга (6)	−22%	−18%	−28%	−33%
Введение 6-оксидофамина в substantia nigra (7)	−29±3%	−36±4%	−32%	−74%
Коагуляция substantia nigra (7)	−23±3%	−24±4%		−37%
Гемисекция на уровне гипоталамуса (6)	−29±7%	−39±2%	−30±3%	−80%

[1)] Крысам инъецировали в желудочек мозга 250 мкг 6-оксидофамина, растворенного в 10 мкл физиологического раствора с 2% аскорбиновой кислоты; контрольные крысы получали тот же объем растворителя. Унилатеральную инъекцию 6-оксидофамина в substantia nigra проводили, как указано в табл. 3. Унилатеральную электрокоагуляцию substantia nigra pars compacta проводили, пропуская ток 80 мА в течение 5 с с последующим гистологическим контролем. Гемисекцию на уровне гипоталамуса проводили с помощью тонкого стеклянного ножа. Животных забивали через 6—30 дней после повреждения и для определения использовали суммарную ткань 1—3 крыс (количество экспериментов указано в скобках). Связывание ^{3}Н-лей-энкефалина с рецепторами 1-го класса (опиатные рецепторы) определяли, инкубируя ткань с 12 нМ ^{3}Н-лей-энкефалина в присутствии или в отсутствие 5 мкМ морфина и вычисляя различия в связывании. Связывание с рецепторами 2-го класса оценивали по разнице значений, полученных при инкубации 70 нМ ^{3}Н-лей-энкефалина в присутствии и в отсутствие 5 мкМ пептида. Связывание ^{3}Н-налоксона определяли после инкубации этого лиганда в концентрации 3 нМ в присутствии и в отсутствие 1 мкМ немеченого налоксона. Значения представлены как средние различия±стандартное отклонение) между связыванием в поврежденной стороне и в контрлатеральной стороне того же животного (за исключением крыс, получавших 6-оксидофамин в желудочек мозга, которых сравнивали с группой контрольных животных). Во всех случаях различия статистически достоверны. Активность ДОФА-декарбоксилазы определяли в аликвотах гомогенатов, используемых для определения связывания, путем инкубации с 0,8 мМ ДОФА, меченной ^{14}С по карбоксильной группе.

причем примерно в равной степени: это означает, что помимо так называемых «опиатных рецепторов» влиянию различных повреждений подвержен также второй класс мест связывания.

После дегенерации дофаминэргических терминалей высокоаффинный захват ^{3}Н-холина (надежный показатель целостности холинэргических нейронов) не изменяется (табл. 3). Поскольку, как известно, дофаминэргические нейроны стриатума замыкаются на холинэргические нейроны, то наблюдаемое снижение количества опиатных рецепторов не может быть результатом процесса транссинаптической дегенерации. Отсутствие существенных изменений в содержании эндорфинов в стриатуме после гемисекции (табл. 5) исключает также и возможность того, что снижение связывания ^{3}Н-лей-энкефалина представляет собой артефакт, обусловленный изменением насыщенности рецепторов эндогенными соединениями, сохраняющимися в процессе выделения мембран.

Следовательно, вероятнее всего, что снижение количества рецепторов в стриатуме после дегенерации дофаминэргических тер-

Таблица 5

Относительные изменения (в процентах) содержания «опиатных» рецепторов и эндорфинов в стриатуме после рассечения мозга на уровне гипоталамуса1)

Время	Связывание ^{3}Н-лей-энкефалина (1-класс)	Содержание в стриатуме		
		мет-энкефалин2)	лей-энкефалин2)	общие эндорфины3)
1-й день (5)	+2 ±4	−2 ±13	+27±28	+1±4
3 дня (4)	−9 ±5	+12 ±12	+53±27	+17±33
7 дней (6)	−29 ±74)	−11 ±7	−13±12	−4±10
30 дней (2)	−46, −24	—	—	—
60 дней (2)	—	+121, +163	—	+50, +86

1) Крыс забивали через различные интервалы времени после рассечения мозга на уровне гипоталамуса. Аликвоты одного и того же гомогената стриатума использовали, как правило, и для определения количества мест связывания ^{3}Н-лей-энкефалина, и для определения содержания различных эндорфинов. Данные представлены как средние значения изменения в процентах (± средняя ошибка) в стриатуме на поврежденной стороне по сравнению с контрлатеральным стриатумом того же животного. Количество экспериментов указано в скобках.

2) Определение проводили с помощью радиоиммунологического теста.

3) Определение проводили с помощью радиорецепторного теста.

4) $p < 0{,}01$.

миналей, вызванной четырьмя различными типами повреждения, свидетельствует о наличии рецепторов эндорфинов на нигро-стриарных дофаминэргических нейронах. При рассмотрении этого заключения следует, однако, отметить, что снижение количества участков связывания ^{3}Н-лей-энкефалина происходит несколько медленнее, чем снижение содержания дофамина: к примеру через 3 дня после гемисекции содержание дофамина снижается уже на 80%, тогда как снижение количества опиатных рецепторов еще нельзя считать достоверным (табл. 5). Однако эти различия в скоростях двух процессов на самом деле не противоречат нашему заключению, поскольку они могут быть обусловлены более медленным исчезновением мембранных компонентов по сравнению с внутриклеточными компонентами дегенерирующих дофаминэргических нейронов. Относительное отсутствие корреляции между снижением числа мест связывания эндорфинов и активности ДОФА-декарбоксилазы после различных повреждений (табл. 4) также нельзя рассматривать как противоречие идее о локализации опиатных рецепторов на дофаминэргических нейронах, поскольку довольно ограниченное снижение числа мест связывания делает такое строгое сравнение затруднительным.

В самом деле, число участков связывания энкефалина снижается максимум на 30% даже после экстенсивной дегенерации дофаминэргических нейронов, охватывающей примерно 90% последних. Следовательно, такая грубая оценка показывает, что примерно треть этих мест связывания в стриатуме локализована на самих дофаминэргических нейронах, а остальные расположены на недофаминэргических нейронах этого участка.

ВЛИЯНИЕ ИНЪЕКЦИЙ КАИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Каиновая кислота, аналог глутамата, оказалась потенциально ценным инструментом для исследования нейронов, обладающих опиатными рецепторами, остающимися после разрушения дофаминэргических нейронов, равно как и энкефалинсодержащих клеток стриатума. Инъекция на стереотаксическом приборе этого агента в стриатум избирательно удаляет нейроны, тела которых расположены вблизи места инъекции (такие, как ГАМК-эргические и холинэргические нейроны), но не затрагивает аксоны и нервные терминали приходящих извне нейронов, таких, как дофаминэргические [54].

Через 5 дней после интрастриарной инъекции 1,5 мкг каиновой кислоты (табл. 6) мы обнаружили снижение на 45±7% количества мест связывания ^{3}H-лей-энкефалина, сопровождающееся снижением на 67±6% захвата холина. Последнее изменение согласуется со снижением активности холинацетилазы, другого пресинаптического маркера холинэргических нейронов, обнаруженным Койлем и Шварцем [17], и с многочисленными данными, показывающими, что эти нейроны являются преимущественно внутренними для стриатума. Если относительное снижение захвата ^{3}H-холина отражает относительное содержание всех типов внутренних нейронов, разрушаемых каиновой кислотой в стриатуме, то можно

Таблица 6

Снижение захвата ^{3}H-холина, связывания ^{3}H-лей-энкефалина и содержания мет-энкефалина в стриатуме после локальной инъекции каиновой кислоты1)

	Контрольная сторона	Поврежденная сторона	Разница, %
Захват ^{3}H-холина, фмоль/мг белка	205±15	69±15	—67±6
Связывание ^{3}H-лей-энкефалина, фмоль/мг белка	123±9	68±8	—45±7
Связывание мет-энкефалина, нмоль/г ткани	1,40±0,27	0,98±0,19	—28±8

1) Крысам вводили 1,5 мкг каиновой кислоты, растворенной в 1 мкл буфера, pH 7.4 (1 мкл/мин), в правый стриатум (координаты: A=8,5; L=2,8; H=4,5 по [3]) и забивали через 5 сут. Захват ^{3}H-холина и связывание ^{3}H-лей-энкефалина морфинузнающими участками определяли в аликвотах одного и того же гомогената стриатума. Приведенные данные представляют собой среднее значение 4 экспериментов±средняя ошибка (по 3 препарата на определение). Отношение относительного снижения в связывании ^{3}H-лей-энкефалина к относительному снижению захвата ^{3}H-холина у индивидуальных животных составляло 66±8%. В дополнительном эксперименте унилатеральная инъекция 1 мкг каиновой кислоты приводила к снижению связывания ^{3}H-лей-энкефалина на 37±5% (среднее значение для 3 животных±средняя ошибка).

заключить, что 66±8% рецепторов эндорфинов в этом участке локализованы на внутренних нейронах. Таким образом, эти данные хорошо согласуются с данными, полученными при избирательной дегенерации дофаминэргических нейронов и позволившими нам заключить, что 30—35% опиатных рецепторов стриатума расположены на дофаминэргических нейронах.

Наблюдается также достоверное снижение содержания мет-энкефалина после интрастриарного введения каиновой кислоты, согласующееся с независимо полученными данными других авторов [29] (а также Чайлдерс и др., данный сборник). Это позволило нам заключить, что часть этих пептидов в стриатуме находится во внутренних нейронах; такое заключение подтверждается иммуногистохимической визуализацией мет-энкефалинсодержащих интернейронов в этом участке мозга [30]. Отметим, однако, следующее: относительное содержание мет-энкефалина снижается несколько слабее, чем захват ^{3}H-холина, что, очевидно, свидетельствует об участии внешних нейронов в поддержании содержания мет-энкефалина в стриатуме. Окончательный вывод по этому поводу сделать затруднительно, поскольку относительное снижение содержания мет-энкефалина не обязательно строго соответствует относительному снижению количества мет-энкефалинсодержащих нейронов из-за возможных изменений в равновесном содержании пептида в остающихся нейронах.

Заключение. Модель взаимодействия энкефалинэргической и дофаминэргической систем в стриатуме

Хотя детали взаимодействия энкефалинэргической и дофаминэргической систем на уровне стриатума будут, очевидно, уточнены в дальнейшем с помощью других подходов, наши данные хорошо укладываются в модель, схематически изображенную на рис. 5. Предполагая, что опиатные рецепторы представляют собой постсинаптические рецепторы для постулированных энкефалинэргических нейронов, мы интерпретируем полученные нами данные как доказательство пресинаптического контакта этих нейронов с терминалями дофаминэргических нейронов. В связи с этим следует отметить, что в течение последних месяцев появилось немало работ, содержащих прямые и косвенные указания на возможность для энкефалинэргических нейронов устанавливать аналогичные аксон-аксонные синапсы в различных частях центральной нервной системы. Так, например, Ламотт и др. [41] обнаружили высокое связывание с опиатными рецепторами в поверхностном слое заднего рога и 50%-ное снижение связывания после дорсальной ризотомии; это было интерпретировано как свидетельство пресинаптической локализации опиатных рецепторов на первичных сенсор-

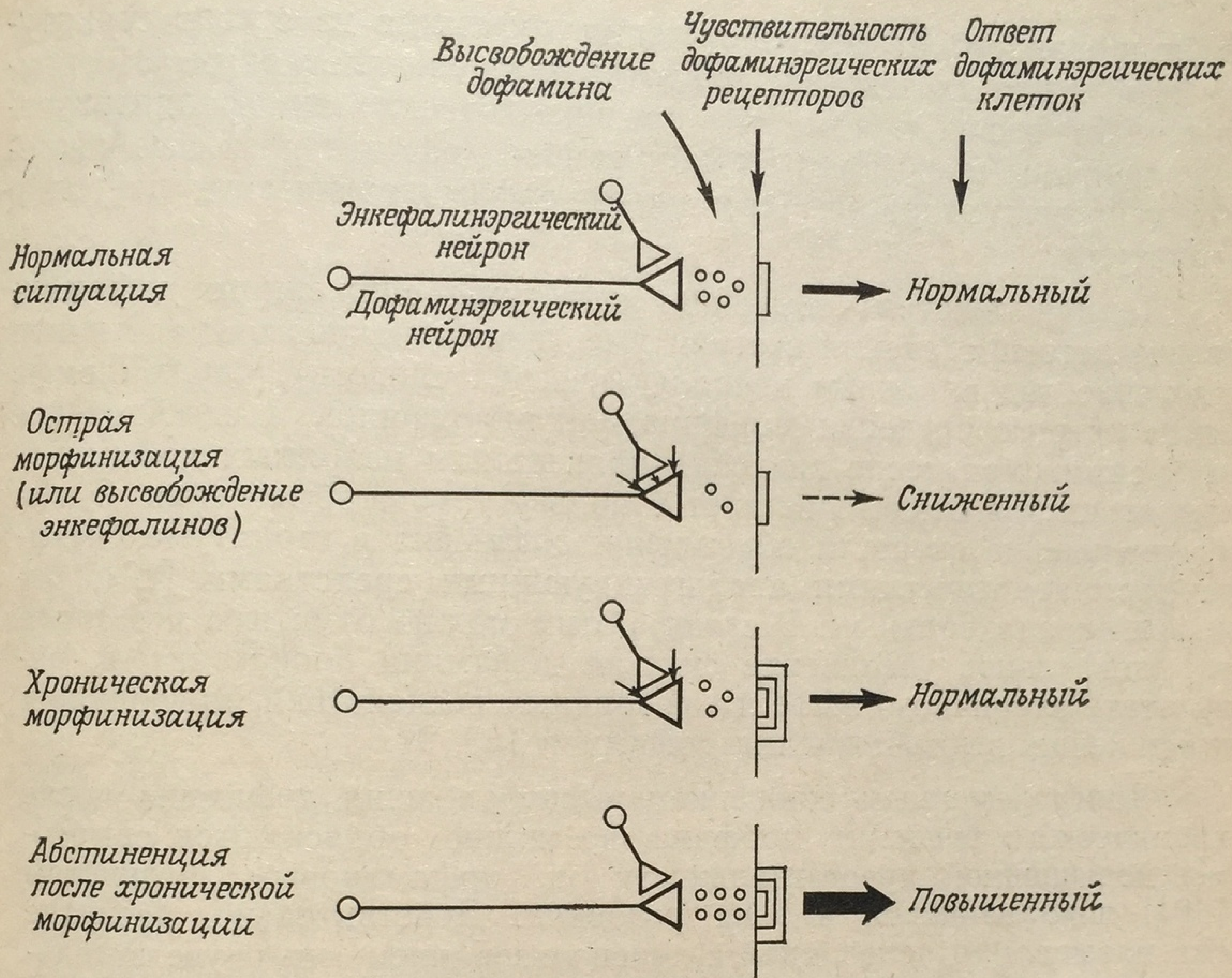

Высвобождение дофамина
Чувствительность дофаминэргических рецепторов
Ответ дофаминэргических клеток
Нормальная ситуация
Энкефалинэргический нейрон
Дофаминэргический нейрон
Нормальный
Острая морфинизация (или высвобождение энкефалинов)
Сниженный
Хроническая морфинизация
Нормальный
Абстиненция после хронической морфинизации
Повышенный

Рис. 5. Предполагаемая модель взаимодействия энкефалинэргических и дофаминэргических нейронов в стриатуме.

ных афферентах спинного мозга. Атвех и Кухар [4] установили пресинаптическую локализацию опиатных рецепторов на вагусном нерве на основании их исчезновения после повреждения нерва. Хёкфельт и др. [31] получили убедительные иммуногистохимические доводы в пользу присутствия в заднем роге и ядре спинального тракта тройничного нерва мет-энкефалинсодержащих интернейронов, образующих аксон-аксонные синапсы с болевыми афферентами этих структур (содержащими вещество Р?). Хотя возможны и другие объяснения, но наши данные, полученные при инъекциях каиновой кислоты, согласуются с существованием аналогичной организации в стриатуме, т. е. энкефалинсодержащих интернейронов, замыкающихся пресинаптически на терминалях для дофаминэргических нейронов.

Каково может быть их действие на дофаминэргические нейроны?

Результаты многочисленных ионофоретических исследований с энкефалинами [8, 18] свидетельствуют о том, что эти соединения обладают преимущественно ингибирующим действием. Далее, в сообщениях Келсенса и Кучинского [10], а также Ло и др. [44] показано, что морфин и различные эндорфины снижают скорость индуцированного K^+ высвобождения дофамина из срезов стриатума крыс и что их действие предотвращается налоксоном. Это подтверждает вывод о том, что пресинаптические энкефалинэргические нейроны оказывают ингибирующее действие на высвобождение нейромедиатора из терминалей дофаминэргических нейронов стриатума.

Данная гипотеза объясняет симптомы сниженного дофаминэргического проведения в стриатуме (напоминающего аналогичное снижение под влиянием нейролептических средств), наблюдаемые после острого введения морфина или эндорфинов, а исчезновение этих симптомов после введения прямых или непрямых дофаминовых агонистов свидетельствует в пользу такого объяснения. Однако увеличение скорости обновления дофамина в стриатуме, вызываемое наркотическими анальгезирующими средствами [12], кажется парадоксальным. В связи с этим можно отметить, что такое парадоксальное увеличение синтеза дофамина происходит в результате вторичного эффекта различных воздействий, приводящих к снижению высвобождения дофамина [53, 9].

Долговременным снижением высвобождения дофамина после хронического введения морфина, возможно, объясняются симптомы повышенной чувствительности к дофаминовым агонистам [40], появляющиеся в этих условиях. Действительно, развитие так называемой «связанной с неиспользованием гиперчувствительности» в дофаминэргической системе стриатума представляет собой общую особенность различного рода обработок, нарушающих дофаминэргическое проведение хроническим или субхроническим образом. Можно себе представить, что эта гиперчувствительность дофаминовых рецепторов может постепенно компенсировать, развившись при хроническом введении морфина, сниженное морфином высвобождение дофамина, и этот механизм может обусловить, по крайней мере частично, развитие толерантности к эффектам морфина в этой системе (рис. 5). Интересно, что, как было недавно показано в нашей лаборатории [13], ингибиторы синтеза белка предотвращают развитие гиперчувствительности дофаминэргических рецепторов, вызываемое α-метил-*п*-тирозином, равно как и развитие толерантности к морфину.

Тот факт, что гиперчувствительность дофаминовых рецепторов большей частью наблюдается на протяжении периода нарушенного дофаминэргического проведения [14], возможно, объясняет синдром абстиненции, или симптомы стремительного сокращения дозы. Когда высвобождение дофамина возвращается к норме (после окончания введения морфина или после инъекции налоксона), то вследствие остающейся гиперчувствительности дофаминовых рецепторов следует ожидать повышенного ответа дофаминрецептивных клеток. Действительно, некоторые симптомы абстинентного синдрома аналогичны таковым, вызываемым сверхстимуляцией дофаминовых рецепторов, и снимаются агентами, блокирующими дофаминовые рецепторы.

Модель, предложенная нами для связи толерантности и зависимости с модифицированным дофаминэргическим проведением в стриатуме, аналогично механизмам, постулированным в общей форме Джейфом и Шарплесом [35], не предполагает появления изменений на уровне самих холинэргических синапсов. Это согласуется с отсутствием изменений в связывании с опиатными рецепторами [50, 37] и в равновесном содержании мет-энкефалина [22] (а также Чайлдерс и др., данное издание) после хронического введения морфина. С другой стороны, эксперименты на клонах гибридных клеток нейробластома/глиома [55] дают основание предполагать, что толерантность к эффектам опиатов может развиваться на стадии «второго посредника», т. е. на уровне внутриклеточного образования циклических нуклеотидов. В связи с этим мы не можем исключить в настоящее время той возможности, что в развитии толерантности и зависимости могут участвовать другие механизмы, отличные от «связанной с неиспользованием гиперчувствительности» дофаминовых рецепторов. В этой связи заметим, что влияние морфина на скорость обновления дофамина в стриатуме постепенно снижается при хроническом введении [39], однако интерпретировать это наблюдение трудно: толерантность может легко возникнуть в результате развития гиперчувствительности дофаминовых рецепторов, участвующих в механизмах регуляции нигростриатума по принципу обратной связи, а также может быть обусловлена изменениями на уровне других нейронов стриатума (холинэргических, ГАМК-эргических), которые, как известно, образуют сеть с дофаминэргическими нейронами и обладают, по-видимому, опиатными рецепторами.

Как уже упоминалось, действие опиатов на болевую систему может объясняться пресинаптическим ингибированием. Мы имеем предварительные данные, полученные при избирательном повреждении дофаминэргических нейронов, иннервирующих лимбическую систему, о том, что опиатные рецепторы могут также присутствовать и на этих дофаминэргических нейронах (в печати). Этим, возможно, и объясняется увеличение скорости обновления дофамина в этих структурах под влиянием наркотических анальгезирующих средств, а также роль эндорфинов в психических расстройствах. Далее, морфин и эндорфины снижают высвобождение не только дофамина и вещества Р [36], но также и других нейромедиаторов мозга, таких, как ацетилхолин и норадреналин [60, 20].

В связи с этим представляется все более и более вероятным, что пресинаптический контроль высвобождения медиаторов со стороны энкефалинэргических нейронов, постулированный нами для стриатума, может представлять собой общую функцию этих нейронов.

Феномен «связанной с неиспользованием гиперчувствительности», т. е. увеличение способности к ответу у клеток-мишеней в результате хронического снижения активации медиаторами, оказывается все более и более общим в центральной нервной системе. В связи с этим можно думать, что постулированная нами модель активности дофаминэргических нейронов в стриатуме может иметь общее значение для объяснения развития толерантности к различным эффектам опиатов и для объяснения вызываемых ими различных симптомов абстиненции.

Список литературы

1. *Agid Y., Javoy F., Glowinski J., Bouvet D., Sotelo C.* Brain Res., **58**, 291—301 (1973).
2. *Akil H., Madden J., Patrick R. L., Barchas J. D.* In: Opiate and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 63—70, North Holland, Amsterdam (1976).
3. *Albe-Fessard D., Stutinsky F., Libouban S.* Atlas Stéréotaxique de Diencephale du rat blanc, ed. du C.N.R.S. (1971).
4. *Atweh S., Kuhar M. J.* Brain Res. (in press).
5. *Audigier Y., Malfroy-Camine B., Virion A., Roy J., Morgat J. L., Schwartz J. C.* C. R. Acad. Sci. (Paris), **284**, 73—76 (1977a).
6. *Audigier Y., Malfroy-Camine B., Schwartz J. C.* Eur. J. Pharmacol., **41**, 247—248 (1977b).
7. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **184**, 630—632 (1976).
8. *Bradley P. B., Briggs I., Gayton R. J., Lambert L. A.* Nature, **261**, 425—426 (1976).
9. *Carlsson A.* In: Pre- and Post-synatpic Receptors, eds. E. Usdin and W. E. Bunney, Marcel Dekker, New York (1975).
10. *Celsens B., Kuschinsky K.* Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol., **284**, 159—165 (1974).
11. *Cheung A. L., Stavinoha W. B., Goldstein A.* Life Sciences, **20**, 1285—1290 (1977).
12. *Costa E., Carenzi A., Guidotti A., Revuelta A.* In: Frontiers in Catecholamine Research, eds. E. Usdin and S. Snyder, pp. 1003—1010, Pergamon Press, New York (1973).
13. *Costentin J., Marcais H., Protais P., Baudry M., de la Baume S., Martres M. P., Schwartz J. C.* Life Sci., **21**, 307—314 (1977).
14. *Costentin J., Protais P., Schwartz J. C.* Nature, **257**, 405—407 (1975).
15. *Cox B. M., Opheim K. E., Teschemacher H., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1777—1782 (1975).
16. *Coy D. H., Kastin A. J., Schally A. V., Morin O., Caron N. G., Labrie F., Walker J. M., Sertel R., Berntson G. G., Sandman C. A.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **73**, 632—638 (1976).
17. *Coyle J. T., Schwarcz R.* Nature, **263**, 244—246 (1976).
18. *Davis J., Dray A.* Nature, **262**, 603—604 (1976).
19. *Desbuquois B., Krug F., Cuatrecasas P.* Biochem. Biophys. Acta, **343**, 101—120 (1974).
20. *Eidelberg E.* In: Progress in Neurobiology, vol. 6, Pergamon Press, Oxford (1976).
21. *Elde R., Hokfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
22. *Fratta W., Yang H. Y. T., Hong J., Costa E.*, Nature, **268**, 452—453 (1977).
23. *Garbay-Jaureguiberry C., Roques B. P., Oberlin R., Anteunis M., Combrisson S., Lallemand J. Y.* FEBS Letters, **76**, 93—98 (1977).
24. *Gauchy C., Agid Y., Glowinski J., Cheramy A.* Eur. J. Pharmacol., **22**, 311—319 (1973).
25. *Glowinski J., Iversen L. L.* J. Neurochem., **13**, 655—669 (1966).

26. *Gros C., Pradelles Ph., Rougeot C., Bepolin O., Dray F., Fournie-Zaluski M. C., Roques B. P., Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J. C.* J. Neurochem. (1977). In press.
27. *Guillemin R., Ling N., Burgus R.* C. R. Acad. Sci. (Paris), **232**, 783—785 (1976).
28. *Hiller J. M., Pearson J., Simon E. J.* Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **6**, 1052—1062 (1973).
29. *Hong J. S., Yang H. Y. T., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 451—453 (1977).
30. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.* Neurosci. Letters, **5**, 25—31 (1977).
31. *Hökfelt T., Ljundahl A., Terenius L., Elde R., Nilsson G.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **74**, 3081—3085 (1977).
32. *Hughes J.* Brain Res., **88**, 295—308 (1975).
33. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, 258, 577—579 (1975).
34. *Jacquet Y. F., Marks N.* Science, **194**, 632—635 (1976).
35. *Jaffe J. H., Sharpless S. K.* Proc. Ass. Res. Nerv. Ment. Dis., **46**, 226—246 (1968).
36. *Jessell T. M., Iversen L. L.* Nature, **268**, 549—551 (1977).
37. *Klee W. A., Streaty F. A.* Nature, **248**, 61—63 (1974).
38. *Kuhar M. J., Pert C. B., Snyder S. H.* Nature, **245**, 447—451 (1973).
39. *Kuschinsky K.* K. Arzneim Forsch. (Drug Res.), **26**, 563—567 (1976).
40. *Lal H.* Life Sci., **17**, 483—496 (1975).
41. *Lamotte C., Pert C. B., Snyder S. H.* Brain Res., **112**, 407—412 (1976).
42. *Laverty R., Taylor K. M.* Analyt. Biochem., 22, 269 (1968).
43. *Llorens-Cortes C., Pollard H., Schwartz J. C., Pradelles Ph., Gros C., Dray F.* Eur. J. Pharmacol. (1977). In press.
44. *Loh H. H., Brase D. A., Sampath-Khanna S., Mar J. B., Way E. L.* Nature, **264**, 567—568 (1976).
45. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, **267**, 495—499 (1977).
46. *Marks N., Grynbaum A., Neidle A.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 1552—1559 (1977).
47. *Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P., Wilkinson S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 1311—1317 (1977).
48. *Parker R. B., Waud D. R.* J. Pharmacol. exp. Ther., **177**, 1—12 (1971).
49. *Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).
50. *Pert C. B., Pasternak G. W., Snyder S. H.* Science, **182**, 1359—1361 (1973).
51. *Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J. C.* Nature, **268**, 745—747 (1977).
52. *Roques B. P., Garbay-Jaureguiberry C., Oberlin R.. Anteunis M., Lala A. K.* Nature, **261**, 778—779 (1976).
53. *Roth R. H.* Eur. J. Pharmacol., **15**, 52—59 (1971).
54. *Schwarcz R., Coyle J. T.* Life Sci., **20**, 431—436 (1977).
55. *Sharma S. K., Klee W. A., Niernberg M.* Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 3092—3096 (1975).
56. *Simantov R., Snyder S. H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 41—48, North Holland, Amsterdam (1976).
57. *Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **70**, 1947—1949 (1973).
58. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, North Holland, Amsterdam (1976).
59. *Tassin J. P., Cheramy A., Blanc C., Thierry A. M.* Brain Res., **107**, 291—315 (1976).
60. *Taube H. D., Borowski E., Endo T., Starke K.* Eur. J. Pharmacol., 38, 377—380 (1976).
61. *Terenius L., Wahlstrom A.* Acta Pharmac. Toxicol., 35, 55 (1974).
62. *Teschemacher R., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A.* Life Sci., 16, 1771—1776 (1975).
63. *Yang H. Y., Hong J. S., Costa E.* Neuropharmacology, **16**, 303—307 (1977).

СИНАПТИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СТРИАТУМЕ КРЫС

А. КАРЕНЦИ, В. ФРИДЖЕНИ, Д. ДЕЛЛА БЕЛЛА

(A. Corenzi, V. Frigeni, D. Della Bella)

Хорошо известно, что инъекция крысам морфина и галоперидола вызывает поведенческие эффекты, связанные с функциональными изменениями моноаминов мозга, особенно в дофаминэргической нигростриарной системе [2, 4, 8]. Так, например, инъекция морфина или галоперидола [2] повышает скорость обновления дофамина в стриатуме, противодействует индуцированному d-амфетамином вращению крыс с односторонней перерезкой нигростриарного тракта [3] и вызывает каталепсию. Однако мы обнаружили большие различия в нейрохимических изменениях, вызываемых этими двумя препаратами в стриатуме крыс [2]. Судя по характеру этих изменений, можно предположить, что галоперидол повышает синтез дофамина, блокируя постсинаптические рецепторы дофамина и активируя межнейронные петли положительной обратной связи, а морфин может действовать на дофаминэргические терминали пресинаптически. Недавно было показано, что морфин и родственные опиаты взаимодействуют со специфическими рецепторными участками, присутствующими в различных участках мозга, особенно сконцентрированными в стриатуме [13]. Это открытие побудило нас продолжить изучение локализации участков действия морфина, оценивая связывание ^{3}H-дигидроморфина (^{3}H-ДГМ) с препаратами мембран стриатума крыс после химического повреждения нигро-стриарного тракта. Инъекция с помощью стереотаксического прибора 6-оксидофамина в substantia nigra, как это было описано Унгерштедом [16], приводит к разрушению дофаминэргических нейронов, простирающих свои аксоны в стриатум. Если специфические рецепторные участки для морфина в стриатуме локализованы пресинаптически на терминалях дофаминэргических нейронов, то можно думать, что стереоспецифическое связывание ^{3}H-ДГМ в препаратах мембран затронутого стриатума будет существенно снижено.

Влияние повреждения нигро-стриарного тракта на стереоспецифическое связывание ^{3}H-ДГМ с препаратами мембран стриатума

Самцам крыс линии Вистар инъецировали с помощью стереотаксического прибора 6-оксидофамин (8 мкг/4 мкл/5 мин) в левую substantia nigra, как описано в работе Унгерштеда [16]. Принимая во внимание, что вызванное апоморфином вращение крыс может служить показателем постсинаптической повышенной чувствительности, обусловленной дегенерацией терминалей дофаминэргических нейронов [16], мы отбирали животных, инъецируя им апоморфин (0,4 мг/кг, подкожно) на 8-й день после повреждения нейронов 6-оксидофамином. Для изучения связывания опиатов (спустя по крайней мере 6 дней после проверки) были использованы только те крысы, которые давали положительный ответ на апоморфин. Мембраны из стриатума крыс получали и анализировали, как описано Пастернаком и др. [12], используя в качестве лиганда различные концентрации ^{3}H-ДГМ (88 Ки/ммоль).

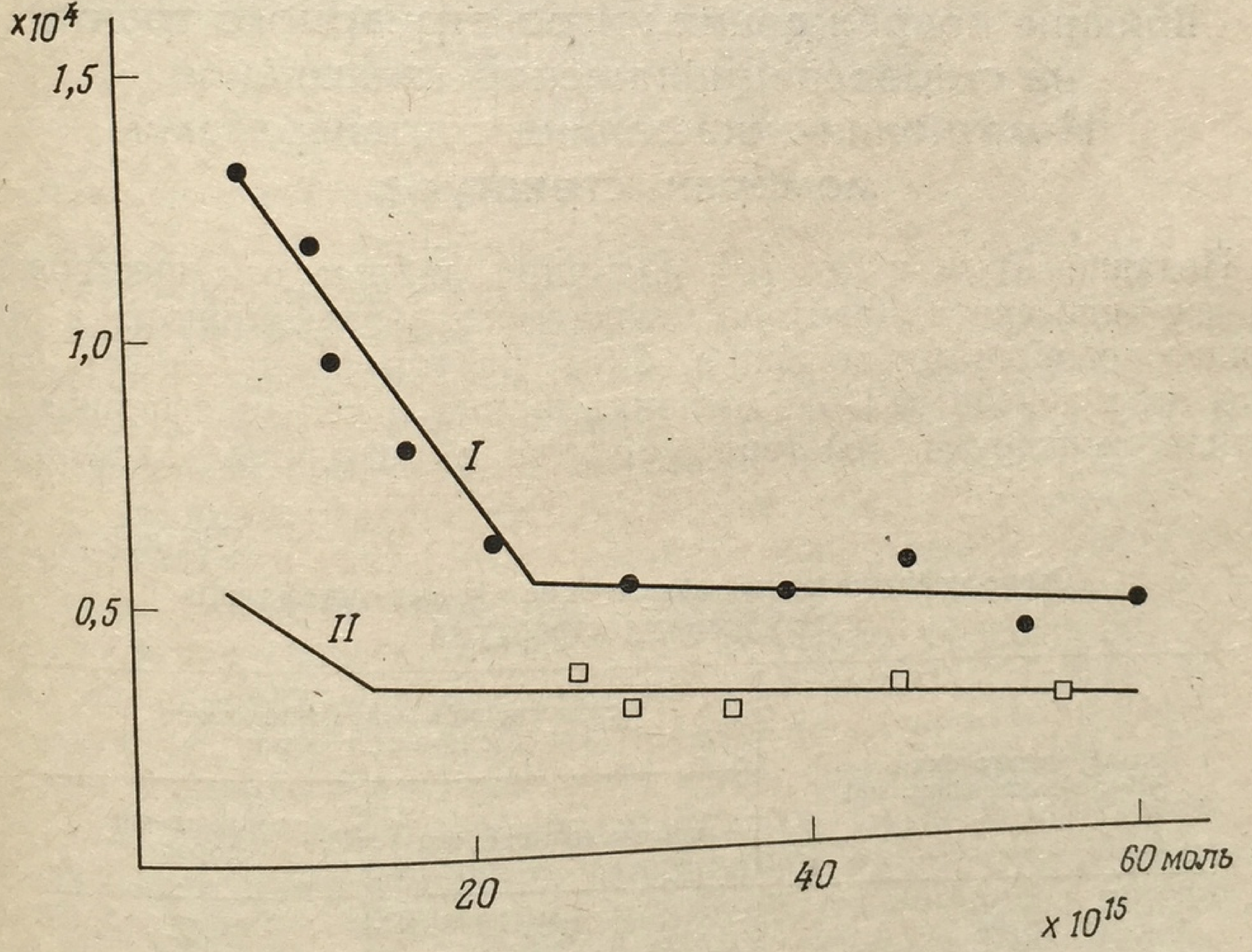


Рис. 1. График Скэтчарда для стереоспецифического связывания ^{3}H-дигидроморфина (^{3}H-ДГМ) с препаратами мембран нормального (*I*) или поврежденного (*II*) стриатума. Связывание определяли, используя различные концентрации ^{3}H-ДГМ в присутствии либо 1 мкМ декстрорфана, либо 1 мкМ леваллорфана. Точки представляют собой средние значения шести различных экспериментов. По оси ординат отложено отношение стереоспецифически связанного ^{3}H-ДГМ к общему содержанию ^{3}H-ДГМ, по оси абсцисс — содержание стереоспецифически связанного ^{3}H-ДГМ.

Стереоспецифическое связывание опиатов определяли как разницу между связыванием ^{3}Н-ДГМ в присутствии либо 1 мкМ декстрорфана, либо 1 мкМ леваллорфана. Мы обнаружили, что стереоспецифическое связывание ^{3}Н-ДГМ с мембранами поврежденного стриатума оказывается на 35% ниже, чем на неповрежденной стороне. Используя график Скэтчарда для анализа связывания ^{3}Н-ДГМ, мы обнаружили, что в препаратах мембран нормального стриатума имеются две различные популяции опиатных рецепторов, как это показали ранее Пастернак и Снайдер [11].

В самом деле, для связывания ^{3}Н-ДГМ в нормальном стриатуме был получен двухфазный график Скэтчарда (рис. 1), что указывает на присутствие высокоаффинных и низкоаффинных мест связывания. Наоборот, в препаратах мембран пораженного стриатума высокоаффинное связывание ^{3}Н-ДГМ отчетливо снижалось. Это свидетельствует о том, что часть опиатных рецепторов, локализованная на пресинаптических дофаминэргических терминалях, может иметь важное функциональное значение.

Влияние повреждения нигро-стриарного тракта на стереоспецифическое связывание ^{3}Н-метионин-энкефалина с препаратами мембран стриатума

Недавно Хьюс и др. [5] получили данные о существовании в мозгу эндогенного фактора, названного «энкефалином» и обладающего свойствами морфина. Этот фактор представляет собой смесь двух пентапептидов: мет-энкефалина и лей-энкефалина. Оба пептида имитируют действие морфина в различных эксперимен-

Таблица 1

Стереоспецифическое связывание ^{3}Н-мет-энкефалина с мембранами стриатума1)

Концентрация ^{3}Н-мет-энкефалина, нМ	Стереоспецифическое связывание, расп./мин/мг белка	
	нормальная сторона	поврежденная сторона
0,25	275	117
0,50	627	430
0,75	1153	610
1,00	1580	897
1,50	2227	1347
2,00	3007	1690

1) Значения представлены как средние двух параллельных измерений в двух независимых экспериментах. Инкубация при 0 °С в течение 60 мин в присутствии либо 1 мкМ декстрорфана, либо 1 мкМ леваллорфана.

тальных системах, но мет-энкефалин оказывается более эффективным, чем лей-энкефалин. Идентификация энкефалина и наличие его тритированной синтетической формы побудили нас исследовать, будет ли стереоспецифическое связывание ^{3}H-мет-энкефалина с мембранами стриатума нарушаться при повреждении 6-оксидофамином.

Как показано в табл. 1, используя различные концентрации ^{3}H-мет-энкефалина, удается обнаружить, что его стереоспецифическое связывание с мембранами пораженного стриатума снижается на 40% по сравнению с таковым в контрлатеральном стриатуме. Мы не располагали достаточными концентрациями лиганда для проведения кинетического анализа. Однако в пределах использованных концентраций (от 0,25 нМ до 2 нМ) повреждение нигростриарного тракта сходным образом влияло как на связывание ^{3}H-ДГМ, так и на связывание ^{3}H-мет-энкефалина.

Влияние интрастриарной инъекции каиновой кислоты на стереоспецифическое связывание ^{3}H-ДГМ в препаратах мембран стриатума

Мак-Гир [10] обнаружил недавно, что введение с помощью стереотаксического прибора каиновой кислоты в стриатум приводит к разрушению элементов сомы и дендритов, оставляя интактными дофаминэргические нервные окончания. Морфологические данные были подтверждены результатами биохимических исследований, в которых было доказано существенное снижение активности дофаминзависимой аденилатциклазы, глутаматдекарбоксилазы и холинацетилтрансферазы и увеличение активности тирозингидроксилазы [10]. Мы решили использовать повреждение стриатума каиновой кислотой в качестве инструмента для дальнейшего исследования локализации опиатных рецепторов в стриатуме. Мы инъецировали с помощью стереотаксического прибора каиновую кислоту в дозе 2 мкг/(мкл/мин) в левый стриатум, как описано в работе Мак-Гира и др. [10]. Контрлатеральный стриатум, в который ничего не инъецировали, служил контролем. Через три дня после инъекции определяли активность аденилатциклазы по методу, описанному ранее [1]; активность фермента в гомогенате стриатума с поврежденной стороны составляла 20—30% от таковой в контралатеральном стриатуме.

Как показано в табл. 2, при различных концентрациях ^{3}H-ДГМ (в диапазоне от 0,25 нМ до 2 нМ) связывание его с препаратами мембран стриатума, в который инъецировали каиновую кислоту, оказывается на 35—40% ниже, чем с мембранами контрлатерального стриатума.

Таблица 2

Стереоспецифическое связывание ^{3}Н-дигидроморфина (^{3}Н-ДГМ) с мембранами нормального и поврежденного каиновой кислотой стриатума

Концентрация ^{3}Н-ДГМ, нМ	Стереоспецифическое связывание, расп./мин/мг белка 1)	
	нормальная сторона	поврежденная сторона
0,25	1028	673
0,50	1809	1150
0,75	2828	1619
1,00	3735	2335
1,50	4771	3259
2,00	5014	4059

1) Значения представлены как средние двух параллельных измерений в двух независимых экспериментах. Инкубация при 25 °С в течение 30 мин в присутствии либо 1 мкМ декстрорфана, либо 1 мкМ леваллорфана.

Для выяснения функциональной значимости опиатных рецепторов, чувствительных к каиновой кислоте, в настоящее время проводятся опыты по изучению кинетики стереоспецифического связывания ^{3}Н-ДГМ с препаратами мембран пораженного стриатума.

Заключение

Наши результаты показывают, что по крайней мере часть (30—40%) опиатных рецепторов локализована на пресинаптических дофаминэргических терминалях. Инъекция 6-оксидофаминовой кислоты в substantia nigra вызывает очень слабое повреждение стриатума по сравнению с тем, которое наблюдается после инъекции в стриатум каиновой кислоты. На этом основании можно предположить, что опиатные рецепторы в высокой степени сконцентрированы на дофаминэргических терминалях нигро-стриарных нейронов. В настоящее время мы не можем исключить возможности конформационных изменений опиатных рецепторов, обусловленных снижением содержания дофамина в пораженном стриатуме. Предварительные эксперименты с использованием ^{3}Н-налоксона в качестве лиганда, по-видимому, могут служить указанием на то, что убыль дофамина приводит к изменению агонистотропной формы опиатных рецепторов в антагонистотропную. Обнаружение рецепторов для морфина и мет-энкефалина на пресинаптических дофаминэргических нервных терминалях согласуется с возможной ролью опиатов в регуляции высвобождения дофамина, как это предполагается различными авторами [2, 7, 9, 14, 15]. Однако снижение стереоспецифического связывания ^{3}Н-ДГМ после повреждения каиновой кислотой может служить указанием на то, что в стриатуме опиатные рецепторы ассоциированы не только с нервными терминалями, но также и с аксоно-дендритными или аксоно-соматическими синапсами.

Список литературы

1. *Carenzi A., Gillin J. C., Guidotti A., Schwartz M. A., Trabucchi M., Wyatt R. T.* Arch. Gen. Psychiatry, **32**, 1056—1059 (1975).
2. *Carenzi A., Guidotti A., Revuelta A., Costa E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **194**, 311—318 (1975).
3. *Carenzi A., Santini V.* Riv. Farmacol. Terap., VII, 449—457 (1976).
4. *Clouet D. H., Ratner M.* Science, **168**, 854—856 (1970).
5. *Hughes J., Smith T., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—579 (1975).
6. *Klotz I. M., Hunston D. L.* Biochemistry, **10**, 3065—3069 (1971).
7. *Kuschinsky K., Hornykiewicz O. Eur. J.* Pharmacol., **19**, 119—122 (1972).
8. *Lal H.* Life Sci., **17**, 483—496 (1975).
9. *Loh H. H., Brase D. A., Sampath-Khanna S., Mar J. B., Way L. E.* Nature, **264**, 567—568 (1976).
10. *McGeer E. G., Innanen V. T., McGeer P. L.* Brain Res., **118**, 356—358 (1976).
11. *Pasternak G. W., Snyder S. H.* Nature, **253**, 563—565 (1975).
12. *Pasternak G. W., Wilson H. A., Snyder S. H.* Mol. Pharmacol., **11**, 340—351 (1975).
13. *Pert C. B., Snyder S. H.* Science, **179**, 184—188 (1973).
14. *Racagni G., Oliverio A., Bruno F., Maggi A., Cattabeni F.* Adv. Biochem. Psychopharmacol., **16**, 565—570 (1977).
15. *Trabucchi M., Spano P. F., Racagni G., Oliverio A.* Brain Res., **114**, 536—540 (1976).
16. *Ungerstedt U.* Acta Physiol. Scand., **367**, 69—93 (1971).

ОПИАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ. РАЗЛИЧНОЕ СРОДСТВО К ЛИГАНДАМ В РАЗНЫХ УЧАСТКАХ МОЗГА

Д. ДЕЛЛА БЕЛЛА, Ф. КАЗАЧЧИ, А. САССИ

(D. Della Bella, F. Casacci, A. Sassi)

Недавно Мартин и др. [4] высказали предположение, что фармакологические и поведенческие реакции, вызываемые различными морфиноподобными веществами у независимых и зависимых спинальных собак-хроников могут отражать взаимодействия этих веществ со специфическими участками различных типов опиатных рецепторов. Они предположили, что можно дифференцировать три типа опиатных рецепторов: μ-рецепторы ϰ-рецепторы σ-рецепторы — и что каждый из них имеет свой специфический лиганд: морфин, кетоциклазоцин и производное бензоморфана (SKF10047) соответственно. Взаимодействие между μ-рецепторами и морфином приводит к фармакологическому эффекту относимому обычно к наркотической анальгезии, а по субъективному ощущению — к эйфорическому синдрому. Активация ϰ-рецепторов кетоциклазоцином приводит к чувству успокоения, а активация σ-рецепторов участвует предположительно в появлении дисфорического и галлюцинаторного синдромов. Далее, агонисты μ-рецепторов, но не ϰ- и μ-агонисты, подавляют синдром снижения дозы у морфинизированных собак при абстиненции.

Предполагаемая молекулярная структура агонистов показана на рис. 1. Можно видеть, что и ϰ-, и σ-агонисты представляют собой производные бензоморфана и что аллильная и циклопропилметильная группы замещают метильную группу при атоме азота. Хорошо известно, что эта структурная особенность характерна для морфиноподобных соединений, представляющих собой смешанные агонисты-антагонисты. Следует также обратить внимание на необычное появление кетогруппы в 2′-положении агониста ϰ-рецепторов.

Общий фармакологический эффект, вызываемый этими соединениями у собак, можно вкратце сформулировать следующим образом: активация μ-рецепторов вызывает замедление пульса и снижение диаметра зрачков, частоты дыхания и температуры тела. Активация σ-рецепторов, напротив, приводит к учащению пульса и увеличению диаметра зрачков частоты дыхания и тем-

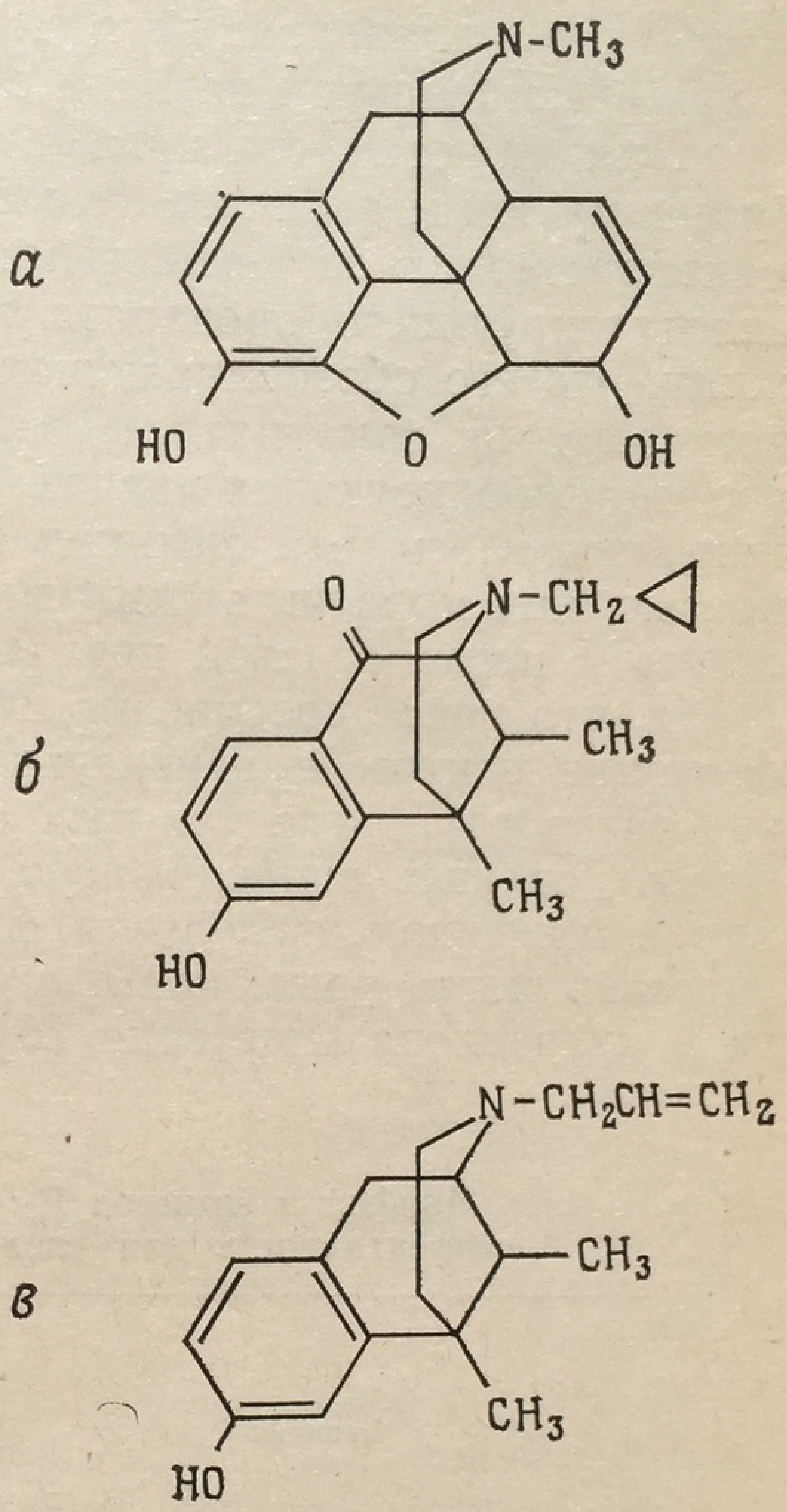


Рис. 1. Молекулярные структуры μ-, ϰ- и σ-агонистов. *а* — морфин (агонист μ-рецепторов), *б* — кетоциклазоцин (агонист ϰ-рецепторов), *в* — SKF 10047 (агонист σ-рецепторов).

пературы тела. При активации ϰ-рецепторов не удается выявить соответствующих фармакологических ответов, за исключением уменьшения диаметра зрачков. В результате анализа фармакологических активностей, оцениваемых по активации специфических рецепторов, можно постулировать следующее: 1) морфин и производное SKF обладают очень высоким сродством к μ-рецепторам, но только у морфина это сродство сопровождается высокой «внутренней», т. е. присущей ему самому, активностью; 2) кетоциклазоцин обладает высоким сродством и «внутренней» активностью по отношению к ϰ-рецепторам; 3) только соединение SKF обладает высоким сродством и «внутренней» активностью по отношению к σ-рецепторам.

В настоящее время мы располагаем данными о локализации и распределении в мозгу постулированных μ-, ϰ- и σ-рецепторов. В связи с этим и принимая во внимание те большие возможности, которые дает изучение стереоспецифического связывания для выяснения механизмов и участков действия опиатов, мы решили попытаться получить некоторую информацию о возможной преимущественной локализации трех различных типов опиатных рецепторов в центральной нервной системе.

Нам кажется, что предыдущие наблюдения соответствуют избранному нами экспериментальному подходу. При изучении фармакологических особенностей стереоизомера виминола R_2, нового анальгезирующего препарата центрального действия, мы обнаружили, что его обезболивающая активность в обычном лабораторном тесте на грызунах выражается величиной того же порядка, что и обезболивающая активность морфина [1]. К нашему удивлению, оказалось, что виминол R_2 обладает более высокой активностью, чем морфин, в снижении возбуждения интернейронов пластины V после болевой периферической стимуляции [2]. Предполагая, что новое соединение преимущественно действует на нижележащие центры в центральной нервной системе, принимающие участие в отработке болевых стимулов, мы попытались, следовательно, оценить вытесняющую активность виминола R_2 в сравнении с морфином, используя фракции синаптосом из различных участков мозга крыс: коры, стриатума, гипоталамуса, ствола мозга и ауэрбахова сплетения [6]. Как показано в табл. 1, морфин примерно с равной эффективностью вытесняет связанный ^{3}H-дигидроморфин (^{3}H-ДГМ) во фракциях синаптосом из различных участков. Пиррилэтаноламиновое производное, виминол R_2, наоборот, обладает более высоким сродством к ауэрбахову сплетению и стволу мозга, чем к препаратам из коры и стриатума.

Таблица 1

Морфин и виминол R_2: сравнительная вытесняющая эффективность для различных препаратов рецепторов

Фракции P_2	Подавление стереоспецифического связывания ^{3}H-дигидроморфина (1,5 нМ)	
	морфин (ED_{50}, нМ)	виминол R_2 (ED_{50}, нМ)
Участки центральной нервной системы:		
Кора мозга	1,30	790
Стриатум	3,90	560
Гипоталамус	1,80	180
Ствол мозга	2,50	120
Ауэрбахово сплетение	1,80	45

Ободренные этими различиями, мы попытались выяснить, различно ли распределение μ-, ϰ и σ-рецепторов между четырьмя разными участками центральной нервной системы: корой, стриатумом, стволом мозга и спинным мозгом. Полученные фракции синаптосом инкубировали с природным лигандом опиатных рецепторов, ^{3}Н-мет-энкефалином или с ^{3}Н-ДГМ. Эксперименты с опиодным пептидом проводили при 4 °C для ограничения инактивации природного лиганда амино- и карбоксипептидазами. Процедура, принятая для препаратов фракции синаптосом фракции P_2, и измерение содержания опиатных рецепторов в различных препаратах описаны у Перта и Снайдера [5]. В качестве агонистов опиатных рецепторов, используемых для вытеснения меченых мет-энкефалина и ДГМ, были выбраны: морфин — для характеристики μ-рецепторов, кетоциклазоцин — для изучения ϰ-рецепторов и производное бензоморфана, SKF 10047, — для определения σ-рецепторов.

Таблица 2

Подавление морфином связывания ^{3}Н-дигидроморфина (^{3}Н-ДГМ) и ^{3}Н-мет-энкефалина с различными препаратами рецепторов

Участки ЦНС	Эффективность действия морфина (ED_{50}, нМ) на стереоспецифическое связывание	
	^{3}Н-ДГМ	^{3}Н-мет-энкефалин
Кора мозга	1,3	100
Стриатум	3,9	100
Ствол мозга	2,5	10
Спинной мозг	Не определяли	45

В табл. 2 приведены значения ED_{50} для морфина в вытеснении ДГМ и мет-энкефалина из фракций синаптосом, полученных из четырех участков центральной нервной системы. Оказалось, что, хотя эффективность морфина в вытеснении ДГМ из различных препаратов центральной нервной системы примерно одинакова, эффективность его в вытеснении мет-энкефалина совершенно различна. В препаратах коры и стриатума значения ED_{50} оказываются достаточно высокими, что подтверждает результаты, полученные ранее Симантовом и Снайдером [7] на мембранах целого мозга, а также Лордом и др. [3] в тех же условиях, но с использованием лей-энкефалина. Однако в стволе мозга и в спинном мозгу значения ED_{50} для морфина оказались неожиданно низкими.

Результаты, полученные с кетоциклазоцином, приведены в табл. 3. Значения ED_{50} для кетоциклазоцина в вытеснении ДГМ оказываются примерно одинаковыми во всех участках мозга, но значения ED_{50} в вытеснении мет-энкефалина в разных участках различны. Агонист ϰ-рецепторов более эффективно вытесняет мет-энкефалин из мембран коры, чем из мембран ствола и спинного мозга.

В табл. 4 показаны совершенно иные результаты, полученные с соединением SKF 10047 в качестве прототипа агонистов σ-ре-

Таблица 3

Подавление кетоциклазоцином связывания ^{3}Н-ДГМ и ^{3}Н-мет-энкефалина различными препаратами рецепторов

Участок ЦНС	Эффективность действия кетоциклазоцина (ED_{50}, нМ) на стереоспецифическое связывание	
	^{3}Н-ДГМ	^{3}Н-мет-энкефалин
Кора мозга	8,9	15,8
Стриатум	15,8	45,4
Ствол мозга	10,2	175
Спинной мозг	28	330

цепторов. Эффективность этого препарата практически одинакова при использовании в качестве лиганда как ДГМ, так и мет-энкефалина. При использовании синаптосом из различных участков мозга никаких существенных различий не обнаружено.

Исходя из этих предварительных экспериментальных данных, мы можем заключить, что в локализации μ-, ϰ- и σ-рецепторов в мозгу имеются некоторые различия. Вывод, к которому мы пришли, состоит в следующем (рис. 2). Морфин и SKF 10047 наиболее активны в вытеснении лиганда, связанного с препаратами ствола головного мозга и спинного мозга. Поскольку эти агонисты специфичны для μ- и σ-рецепторов и обладают наибольшей эффективностью в стволе мозга и спинном мозгу, мы предполагаем, что оба участка богаты μ- и σ-рецепторами.

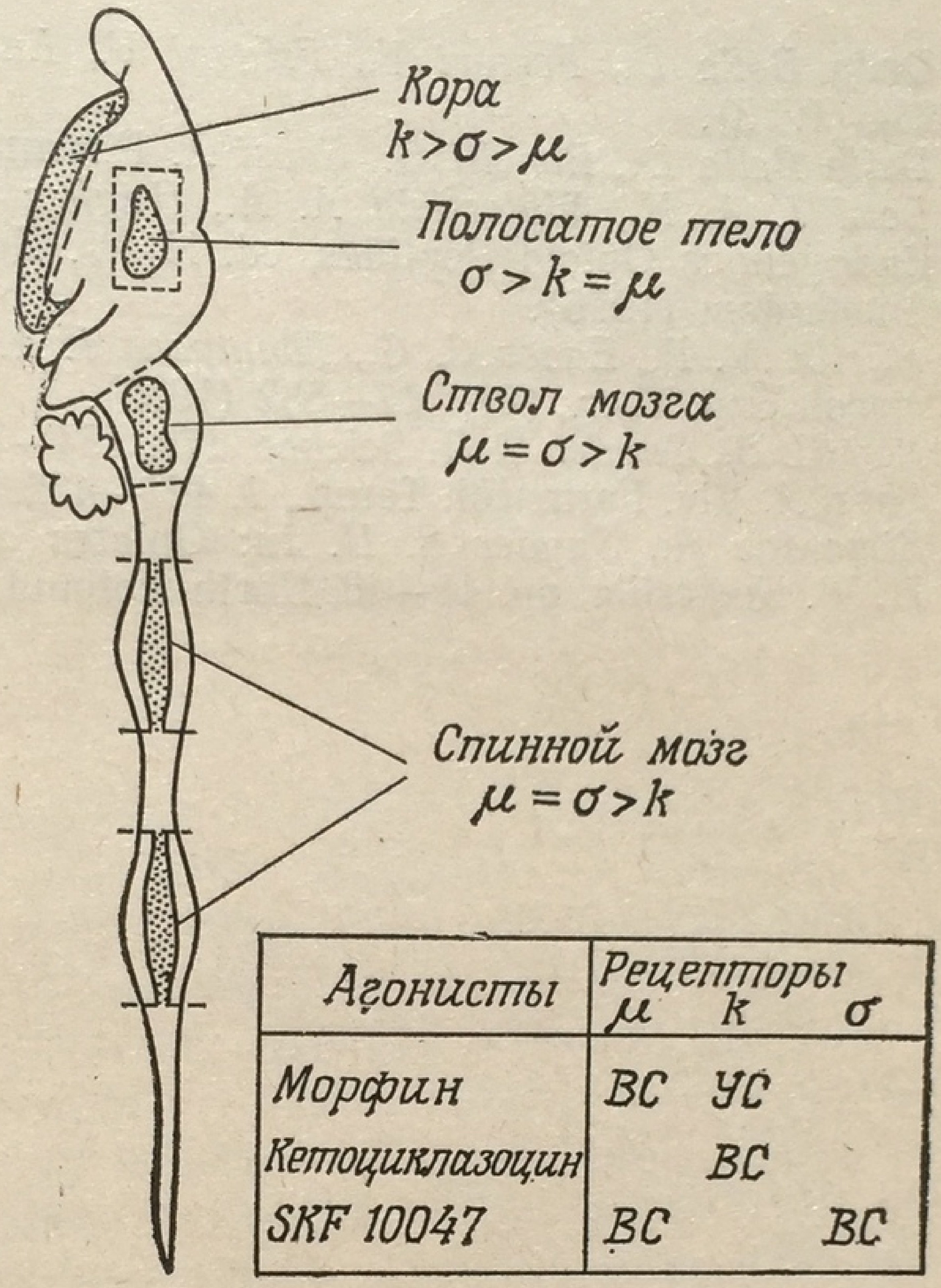
SKF 10047 обладает более высокой конкурентной активностью, чем морфин во фракции синаптосом стриатума; судя по этим различиям, можно предположить, что стриатум характеризуется более высокой плотностью σ-рецепторов. И ϰ-, и μ-агонисты обладают относительно низким сродством к опиатным рецепторам в стриатуме. Очень заманчиво скоррелировать эти данные со способностью соединения SKF вызывать дисфорическую и галлюцинаторную реакцию.

Таблица 4

Подавление соединением SKF 10047 связывания ^{3}Н-ДГМ и ^{3}Н-мет-энкефалина с различными препаратами рецепторов

Участок ЦНС	Эффективность действия SKF10047 (ED_{50}, нМ) на стереоспецифическое связывание	
	^{3}Н-ДГМ	^{3}Н-мет-энкефалин
Кора мозга	13,5	28,4
Стриатум	25,2	28,2
Ствол мозга	12,5	11,2
Спинной мозг	56	12,5

Рис. 2. Предполагаемое распределение μ-, ϰ- и σ-рецепторов в центральной нервной системе по данным Мартина и др. [4]. ВС — высокое сродство, УС — умеренное сродство.



Агонисты	Рецепторы μ	k	σ
Морфин	ВС	УС	
Кетоциклазоцин		ВС	
SKF 10047	ВС		ВС

Агонист ϰ-рецепторов кетоциклазоцин вытесняет мет-энкефалин и ДГМ из кортикальных синаптосом эффективнее, чем морфин и SKF 10047, причем морфин практически лишен активности. Было бы интересно сопоставить эти экспериментальные результаты со способностью кетоциклазоцина оказывать успокаивающее действие и улучшать координацию движений.

Заключение

Сравнение результатов, полученных в различных участках центральной нервной системы, подтверждает гипотезу о том, что плотность различных типов опиатных рецепторов, исследованных с помощью агонистических препаратов, различна в разных участках мозга. Поскольку вытеснение мет-энкефалина из одного и того же участка варьирует в зависимости от используемого прототипа агониста, мы можем с достаточным основанием исключить зависимость характера вытеснения мет-энкефалина в различных участках от содержания специфических пептидаз или ингибиторов пептидаз. Полученные результаты подтверждают правильность проведенного Мартином и др. [4] дифференцирования опиатных рецепторов и свидетельствуют о преимущественной локализации различных типов рецепторов в разных участках центральной нервной системы.

Список литературы

1. *Della Bella D., Ferrari V., Frigeni V., Lualdi P.* Nature New Biol., **241**, 282—284 (1973).
2. *Della Bella D., Benelli G., Sassi A.* Pharmacol. Res. Comm., **8**, 111—126 (1976).
3. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 275—280, North-Holland, Amsterdam (1976).
4. *Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **197**, 517—532 (1976).
5. *Pert C. B., Snyder S. H.* Science, **179**, 184—188 (1973).
6. *Sassi A.* Riv. Farmacol. Terap., 7, 427—432 (1976).
7. *Simantov R., Snyder S. H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 41—48, North-Holland, Amsterdam (1976).

ДЕЙСТВИЕ МОРФИНА И β-ЭНДОРФИНА НА СИНТЕЗ РНК

Н. М. ЛИ, Г. Г. ЛО, Ч.-Х. ЛИ

(N. M. Lee, H. Loh, C. H. Li)

Ранее были приведены данные о том, что развитие толерантности к анальгезирующему действию морфина у крыс и мышей может быть заторможено или предотвращено лекарственными препаратами, которые тем или иным образом подавляют синтез РНК в мозгу [2, 3, 4, 15]. Большинство данных о роли синтеза РНК и белка в развитии толерантности — зависимости являются непрямыми. При постановке in vivo экспериментов такого типа возникают проблемы проникновения, распределения, транспорта, метаболизма и модификации исследуемых компонентов, что весьма затрудняет интерпретацию результатов. Если макромолекулы, такие, как РНК, ответственны за развитие толерантности, важно установить, на какой стадии морфин оказывает прямое или непрямое действие на последовательность событий, приводящих к возникновению толерантности.

В мозгу, как и в других тканях, генетическая информация хранится в хроматине каждой клетки. Хроматин представляет собой солюбилизированный ядерный дезоксирибонуклеопротеидный комплекс. Его главными компонентами являются комплекс ДНК с гистонами, негистоновые белки, РНК и фосфолипиды. При инкубации хроматина с экзогенными предшественниками РНК (т. е. ATP, GTP, UTP и CTP) и ДНК-зависимой РНК-полимеразой на доступных ДНК-матрицах может синтезироваться РНК. Скорость синтеза РНК служит мерой матричной активности хроматина. Синтез РНК может регулироваться активностью РНК-полимеразы или белками или другими компонентами, ассоциированными с ДНК. В общем случае матричная активность изолированного хроматина чрезвычайно мала по сравнению с таковой депротеинизированной ДНК. Гистоновые белки, как правило, ингибируют [10], а негистоновые белки — стимулируют [14] матричную активность ДНК. Белки хроматина могут быть ферментативно модифицированы путем фосфорилирования, метилирования или ацетилирования. Существует предположение, что такая модификация может иметь важное значение для регуляции фенотипического выражения генов [16]. Другие компоненты хроматина, например липиды, также участвуют в регуляции выражения генов. Было показано, что содержание фосфолипидов в активном эухроматине выше, чем в репрессированном гетерохроматине [5, 6]. Эти данные дают основание думать, что фосфолипиды могут служить положительными регуляторами выражения генов.

Ранее мы показали, что хроматин, выделенный из олигодендроглиальных ядер толерантно-зависимых мышей обладает повышенной матричной активностью по сравнению с хроматином из контрольных животных [8]. Этот эффект был наркотикоспецифическим, поскольку не выявлялся в случае предварительного воздействия налоксоном. Этот эффект был также клеточно- и органоспецифическим, поскольку препараты хроматина из смешанных ядер мозга или из ядер печени толерантных животных не обладали повышенной матричной активностью (Ли и Ло, неопубликованные данные).

Как обсуждалось ранее, экспрессия генов может регулироваться благодаря взаимодействию гистонов, негистоновых белков и фосфолипидов с ДНК хроматина. Следовательно, увеличение матричной активности хроматина у толерантных животных может быть обусловлено изменением метаболизма этих компонентов хроматина. Для определения действия морфина на уровне транскрипции мы проанализировали эти компоненты в связи с образованием РНК. Хроническое введение морфина приводит к увеличению фосфорилирования белков хроматина. Фосфорилируются главным образом кислые белки хроматина [12]. Активность связанной с хроматином метилтрансферазы не изменяется при хроническом введении морфина (Ли и Ло, неопубликованные данные); следовательно, не все связанные с хроматином белки оказываются затронутыми при хроническом воздействии морфином. В нашей лаборатории было также проведено исследование связанной с хроматином РНК-полимеразы, ответственной за синтез РНК. Мы отделили ферментативную активность от хроматина и частично очистили фермент на колонке с ДЭАЭ-сефадексом. В элюате, полученном с колонки, обнаружены три пика активности (Стоукс, Ли и Ло, неопубликованные данные). Хроническая имплантация пилюли морфина приводит к снижению активности только одной фракции РНК-полимеразы (табл. 1). Активность фракции I снижается до 25% от уровня, наблюдаемого у контрольных животных, получавших плацебо. Предварительная имплантация животным пилюли с 10 мг налоксона предотвращает снижение активности фракции I, вызываемое хронической имплантацией морфиновой пилюли. Добавление морфинсульфата (до 10^{-4} М) в систему для определения активности РНК-полимеразы in vitro не оказывает действия на включение ^{3}H-UTP.

Нам не удалось продемонстрировать влияние морфина in vitro ни на матричную активность, ни на фосфорилирование кислых

Таблица 1

Активность РНК-полимеразы в олигодендроглии мозга мышей после хронического воздействия морфином

Воздействие	Удельная активность (количество UTP, включившегося на 1 мг белка, пмоль)		
	Фракция I	Фракция II	Фракция III
Плацебо	$14{,}41 \pm 1{,}52$	$22{,}85 \pm 2{,}73$	$4{,}53 \pm 0{,}88$
Мюрфин	$3{,}50 \pm 1{,}11$	$24{,}39 \pm 4{,}06$	$4{,}12 \pm 1{,}11$
	$p < 0{,}0025$	$p > 0{,}05$	$p > 0{,}05$

белков, ни на активность РНК-полимеразы; следовательно, морфин не оказывает непосредственного действия на эти реакции. Таким образом, действие хронического воздействия морфина in vivo, возможно, реализуется через какие-то другие механизмы, связанные с синтезом РНК.

Недавнее открытие эндорфинов [7, 9, 13, 18] и выявление перекрестной толерантности и зависимости между морфином и β-эндорфином [19] стимулировало появление многочисленных работ, посвященных изучению взаимосвязи между опиатами и этими опиоидными пептидами. В свете приведенных выше данных и способности многих гормонов изменять выражение генов, что проявляется в стимуляции синтеза белка и (или) РНК в клетках-мишенях, нам представлялось важным оценить действие опиодных пептидов в использованной нами системе синтеза РНК.

Мы установили, что β-эндорфин и родственные пептиды оказывают прямое стимулирующее действие на включение UTP, зависящее от ДНК или хроматина мозга. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что синтетический β-эндорфин вызывает увеличение матричной активности ДНК тимуса теленка; реакция также оказывается чувствительной к рифампицину и актиномицину D. Стимуляция матричной активности пептидами требует присутствия как матрицы, так и РНК-полимеразы.

Таблица 2

Влияние других соединений на включение UTP в РНК

Условия	Включение, ^{3}H-UTP, %
1. Контроль	100
2. +β-эндорфин ($5.8 \cdot 10^{-5}$ M)	202
3. +β-эндорфин ($5{,}8 \cdot 10^{-5}$ M) +рифампицин (0,4 мкг/мл)	0
4. +β-эндорфин ($5.8 \cdot 10^{-5}$ M) +актиномицин D (40 мкг/мл)	0

Таблица 3

Матричная активность хроматина в присутствии и в отсутствие β-эндорфина и родственных пептидов[1]

Пептиды	Концентрация, 10^{-5} М	Удельная активность (включение ^{3}H-UTP, нмоль/мг ДНК)	Стимуляция, %
Без добавок	0	1,02	0
β-Липотропин	6	2,30	125
β-Эндорфин	0,011	1,0	0
	0,11	1,31	29
	3,0	1,89	85
	6,0	2,30	125
β-Меланотропин	3	1,17	15
	6	1,33	30
Мет-энкефалин	6	1,07	5
	20	1,12	10

[1] Экспериментальные условия такие же, как и указанные в подписи к рис. 2.

В табл. 3 показано, что β-липотропин также активен в стимуляции образования РНК с использованием ДНК тимуса теленка в качестве матрицы. Синтетический β-меланотропин, последовательность которого соответствует последовательности β-липотропина на участке 41—58, оказался лишь мало активным. Мет-энкефалин, представляющий собой фрагмент β-липотропина с 61-го по 65-й остатки, неактивен в этой системе вплоть до концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Мы изучали профиль плавления ДНК тимуса теленка в присутствии этих пептидов (рис. 1), чтобы выяснить, изменяют ли опиоидные пептиды стабильность ДНК, что может приводить к увеличению матричной активности. ДНК тимуса теленка характеризуется относительно простой сигмоидной кривой плавления с значением $T_{пл}$ 71 °С. В присутствии β-эндорфина, β-липотропина и β-меланотропина профиль правления ДНК не изменяется; следовательно, стимуляция пептидами матричной активности не связана с дестабилизацией ДНК этими пептидами.

Однако в настоящее время широко известно, что скорость образования РНК на ДНК-матрице зависит от многих факторов, и в частности от количества имеющихся участков инициации синтеза РНК. Для исследования такой возможности мы определили включение ^{3}H-UTP при низкой ионной силе в присутствии GTP, ATP, UTP и в присутствии или в отсутствие β-эндорфина. В этих условиях может происходить только инициация, а вклад элонгации и терминации должен быть невелик из-за отсутствия четвертого нуклеозидтрифосфата, CTP. Результаты (рис. 2) показывают, что в присутствии β-эндорфина действительно наблюдается снижение

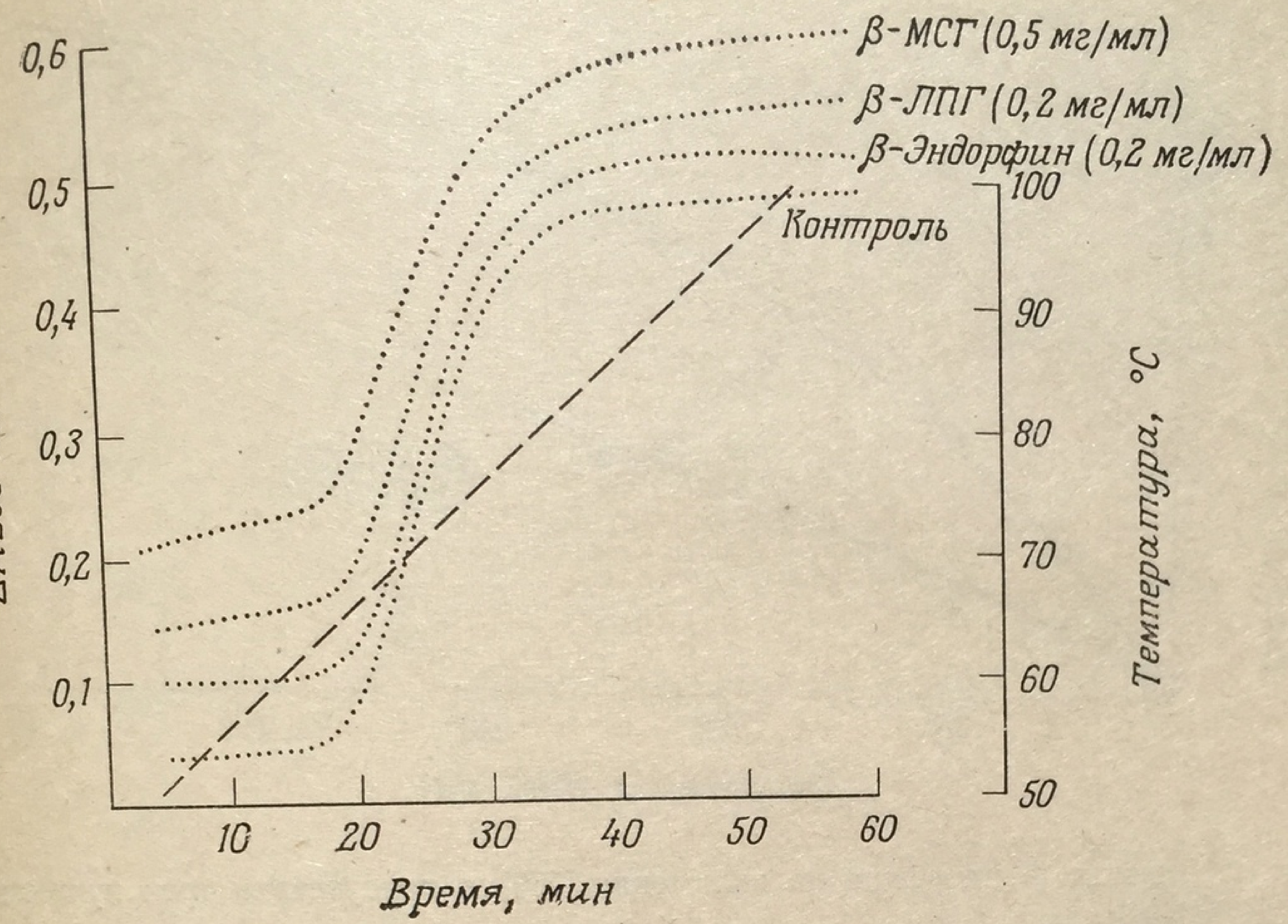


Рис. 1. Профили плавления ДНК в присутствии или в отсутствие β-эндорфина, β-липотропина (ЛПГ) или β-меланотропина (МСГ).
Среда содержала 10 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,8, и ДНК тимуса теленка (100 мкг/мл). Соответственно добавляли различные количества пептидов. Поглощение при 260 нм четырех препаратов в закрытых тефлоновыми крышками кюветах, равно как и температура под держателем кювет, регистрировались автоматически с помощью спектрофотометра «Гилфорд», модель 250, сопряженного с термопрограммером «Гилфорд». Все препараты анализировали последовательно. Температура изменялась в диапазоне от 50 до 100 °С со скоростью 1°/мин.

количества участков инициации. Вместе с тем полученные нами сравнительно недавно результаты показывают, что β-эндорфин повышает скорость элонгации полинуклеотидной цепи. Вполне возможно, что это связано с влиянием β-эндорфина на синтез РНК.

Тот факт, что в опытах с хроматином мозга β-эндорфин значительно активнее стимулировал синтез РНК, чем при использовании очищенной ДНК в качестве матрицы, побудил нас исследовать другие возможные взаимодействия между β-эндорфином и компонентами хроматина (рис. 3).

Вюрстер и др. [20, 21] показали, что морфиноподобные лекарственные препараты вызывают изменения в свойствах мембран как в случае лейкоцитов млекопитающих, так и в случае бактериальных клеток. В использованной ими бактериальной системе леворфанол оказался способным увеличивать биосинтез кардиолипина и снижать его распад. Более того, включение предшественников в фосфатидилэтаноламин заметно снижалось. Были отмечены также изменения в метаболизме фосфолипидов в тканях мозга

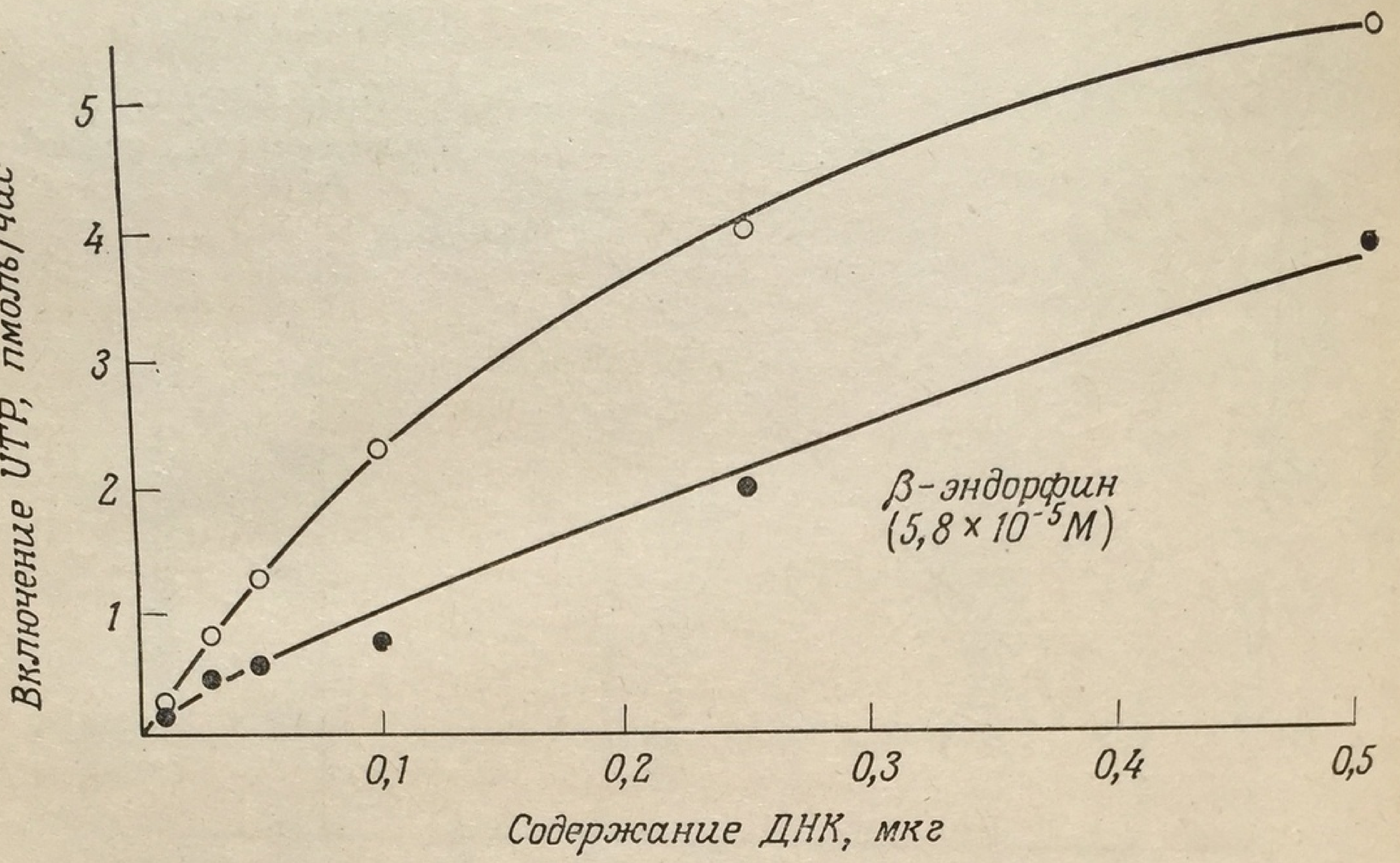


Рис. 2. Влияние β-эндорфина на включение UTP в присутствии трех нуклеозидтрифосфатов.
Пять единиц РНК-полимеразы из *E. coli* К-12 и ДНК тимуса теленка (0,02 мкг) инкубировали в 0,25 мл при 37 °С в течение 15 мин. Реакционная смесь включала: *трис*-HCl, 80 мМ (pH 8,3, 23 °C); 100 мМ NaCl; 4 мМ MgCl$_2$; 2 мМ MnCl$_2$; 6 мМ дитиотреитол, 20 мкг бентонита, по 0,1 мМ GTP, ATP, UTP и ^{3}H-UTP ($5 \cdot 10^{-6}$ имп./мин) в присутствии или в отсутствие $5{,}8 \cdot 10^{-5}$ М β-эндорфина.

под действием наркотических препаратов [1, 11]. Недавно было показано, что хроническое воздействие морфином приводит к изменению содержания некоторых липидов в микросомах и во фракции синаптических плазматических мембран (Нацуки и Ло, неопубликованные данные. Из исследованных липидов морфин при хроническом воздействии увеличивал содержание фракции цереброзидсульфат+ганглиозиды и фракцию кислых липидов, но снижал содержание нейтральных липидов в синаптических плазматических мембранах коры головного мозга крыс. Во фракции микросом наиболее заметные изменения наблюдались в нейтральных липидах содержание которых у толерантных животных увеличивалось более чем в два раза.

Чтобы установить причину увеличения матричной активности у толерантных к морфину животных, мы изучили также роль липидов в синтезе РНК in vitro. Мы обнаружили, что кардиолипин, фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин входят в состав хроматина. Эффекты этих липидов определяли в системе ДНК-зависимого включения UTP (табл. 4). Важно отметить, что и цереброзидсульфат, и кардиолипин оказывают стимулирующее действие в присутствии хроматина

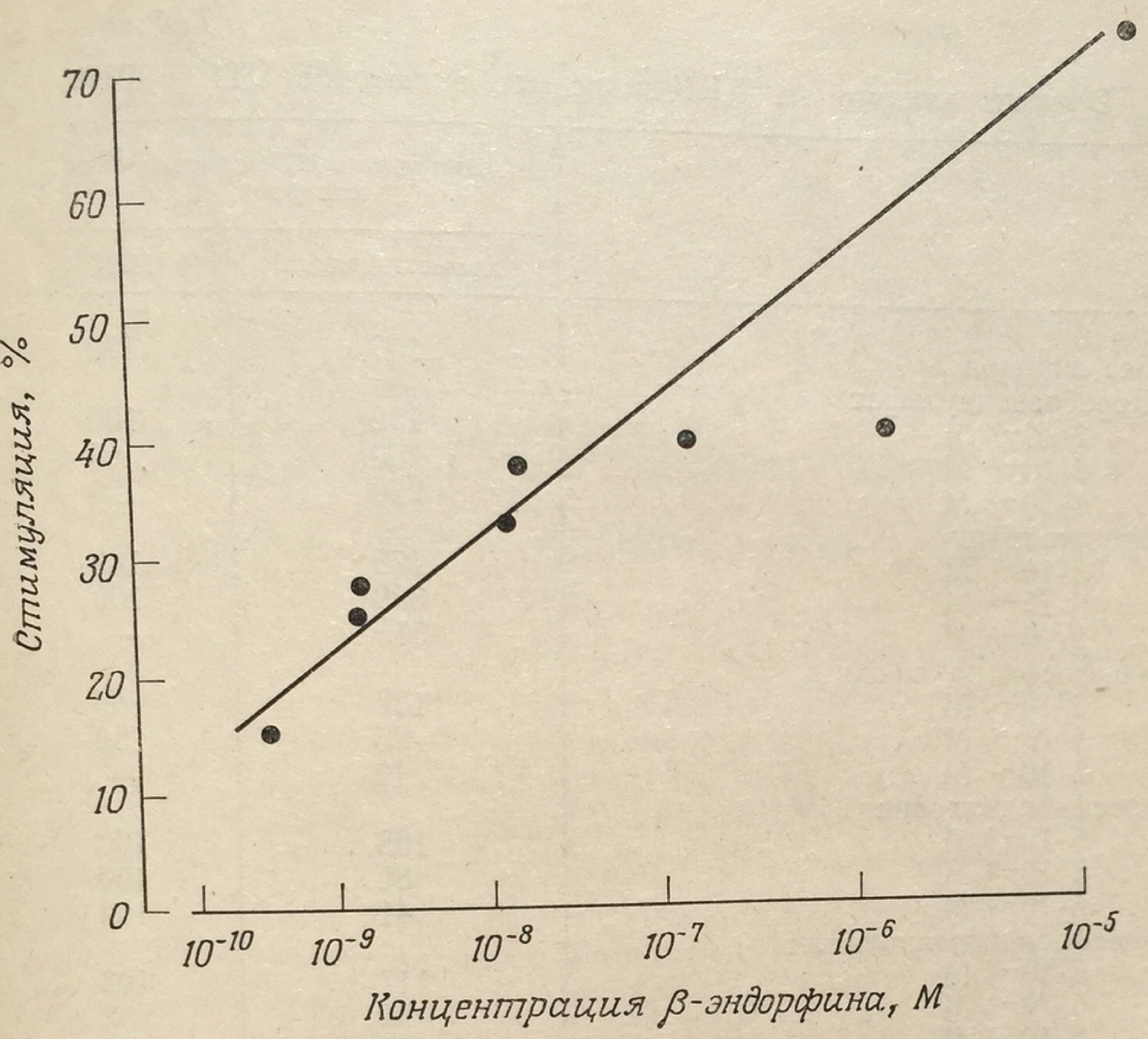


Рис. 3. Влияние различных концентраций β-эндорфина на хроматинозависимое включение UTP в мозгу. Экспериментальная процедура такая же, как и описанная в подписи к рис. 2. Количество хроматина соответствует 80 мкг белка.

мозга и неактивны при использовании в качестве матрицы депротеинизированной ДНК. Трифосфатидилинозит оказывал стимулирующее действие только при концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М и превращался в ингибитор при более высокой концентрации. Фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин оказывали ингибирующее действие при всех использованных концентрациях, а фосфатидилсерин не был активен ни с хроматином мозга, ни с депротеинизированной ДНК. Возможно, следовательно, что липопротеидный комплекс, образуемый фосфолипидами и некоторыми негистоновыми белками, вызывает конформационные изменения белков хроматина и таким образом может увеличивать доступность промоторных участков генов для РНК-полимеразы.

Несомненно, если хроническая обработка морфином изменяет метаболизм липидов, это может приводить к изменению содержания липидов в различных субклеточных фракциях и в результате непрямым образом изменять метаболизм макромолекул. Однако возможно также, что изменения в содержании липидов могут приводить к синтезу различных РНК. В настоящее время мы иссле-

Таблица 4

Влияние липидов на ДНК-зависимое включение UTP в РНК

	Включение UTP относительно контроля, %	
	хромотин мозга	ДНК
Без липидов	100	100
Цереброзидсульфат		
$5\cdot10^{-7}$ M	132	100
$5\cdot10^{-6}$ M	250	96
$5\cdot10^{-5}$ M	220	70
Кардиолипин		
$5\cdot10^{-7}$ M	175	100
$5\cdot10^{-6}$ M	330	100
$5\cdot10^{-5}$ M	515	—
Трифосфатидилинозит		
$5\cdot10^{-7}$ M	137	86
$5\cdot10^{-6}$ M	95	50
$5\cdot10^{-5}$ M	40	—
Фосфатидилхолин		
$5\cdot10^{-7}$ M	108	100
$5\cdot10^{-6}$ M	86	100
$5\cdot10^{-5}$ M	41	100
Фосфатидилэтаноламин		
$5\cdot10^{-7}$ M	117	103
$5\cdot10^{-6}$ M	92	92
$5\cdot10^{-5}$ M	25	87

дуем эти возможности и надеемся выяснить механизм действия этих липидов на матричную активность хроматина и их возможное взаимодействие с β-эндорфином.

* *
*

Авторы приносят благодарность Ингрид Унрук за техническую помощь.

Список литературы

1. *Brossard M., Quastel J. H.* Biochem. Pharmacol., **12**, 766—768 (1963).
2. *Cohen M., Keats A. S., Krivoy W., Ungar G.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **119**, 381—384 (1965).
3. *Cox B. M., Ginsberg M., Osman O. H.* Brit. J. Pharmacol., **33**, 245—256 (1968).
4. *Cox B. M., Osman O. H.* Brit. J. Pharmacol., **38**, 157—170 (1970).
5. *Frenster J. H.* Nature, **206**, 680—683 (1965).
6. *Frenster J. H.* In: Handbook of Molecular Cytology, ed. A. Lima-de-Faria, pp. 251—276, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1969).
7. *Hughes J. Brain Res.*, **88**, 295—308 (1975).
8. *Lee N. M., Ho I. K., Loh H. H.* Biochem. Pharmacol., **24**, 1983—1987 (1975).
9. *Li C. H.. Chung D.* Nature, **260**, 622—624 (1976).

10. *Mirsky A. E., Silverman B.* P.N.A.S. USA, **70**, 1973—1975 (1973).
11. *Mulé S. J.* Res. Publ. Ass. Res. Narc. Ment. Dis., **46**, 32 (1968).
12. *Oguri K., Lee N. M., Loh H. H.* Biochem. Pharmacol., **25**, 2371—2376 (1976).
13. *Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).
14. *Rickwood D., Threlfall A. G., MacGillivray A. J., Paul J.* Biochem. J., **129**, 50P (1972).
15. *Spoerlein M. T., Scrafani J.* Life Sci., **6**, 1549—1556 (1967).
16. *Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J.* Science, **183**, 817—824 (1974).
17. *Tata J. R.* In: Biochemical Action of Hormones, vol. 1, ed. G. Litwach, pp. 89—134, Academic Press, New York (1970).
18. *Terenius L., Wahlström A.* Acta Pharm. Tox. (Suppl. 1), **35**, 55 (1974).
19. *Wei E., Loh H.* Science, **193**, 1262—1263 (1976).
20. *Wurster N., Elsbach P., Rand J. Simon E. J.* Biochim. Biophys. Acta, **248**, 282—292 (1971).
21. *Wurster N., Elsbach P., Simon E. J., Pettis P., Lebow S.* J. Clin. Invest., **50**, 1091—1099 (1971).

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФИНА И МЕТИОНИН-ЭНКЕФАЛИНА IN VIVO И IN VITRO. ЗАВИСИМЫЙ ОТ ГЕНОТИПА ОТВЕТ У ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ

Г. РАҚАНЬИ, Ф. БРУНО, Е. ЮЛИАНО, Д. ЛОНЖИАВЕ,
В. МАНДЕЛЛИ, Ф. БЕРТИ

(G. Racagni, F. Bruno, E. Iuliano, D. Longiave,
V. Mandelli, F. Berti)

Введение

Существование эндогенных лигандов, обладающих сродством к опиатным рецепторам, установлено твердо [7, 13, 18, 19]. Эти соединения представляют собой полипептидные фрагменты β-липотропина. Қ ним, в частности, относится пентапептид мет-энкефалин, содержащий с 61-го по 65-й остатки аминокислот β-липотропина. Поскольку мет-энкефалин в тканях неустойчив [14], его опиоидное действие изучалось главным образом на изолированных органах [7]. Кроме того, изучение in vivo ограничено необходимостью использовать высокие дозы исследуемого вещества и внутримозговой (внутрижелудочковый) путь введения [16]. Целью настоящего сообщения является сравнение действия мет-энкефалина и морфина на анальгезию и на двигательную активность в двух линиях мышей.

Как показали недавние исследования, чувствительность к анальгезирующему действию морфина и к его способности стимулировать двигательную активность детерминированы генетически [2]. Так, мыши C57BL/6J (C57) обладают высокой чувствительностью к вызванному морфином усилению двигательной активности, но слабо чувствительны к анальгезирующему действию морфина [2, 12]. И наоборот, мыши DBA/2J (DBA) чрезвычайно чувствительны к анальгезирующему действию морфина, а их двигательная активность относительно слабо чувствительна к морфину [12]. В связи с этим представляло интерес провести анализ in vivo и in vitro фармакологических и биохимических различий между мышами этих линий и установить, оказывает ли мет-энкефалин такое же зависимое от линии действие, как и морфин.

Фармакологическое изучение эффектов морфина и мет-энкефалина у двух линий мышей

Были использованы мыши C57 и DBA (Джексоновская лаборатория, Бар-Харбор, Мэйн) и мыши Свисс. Степень анальгезии определяли методом горячей пластинки [5]. В качестве критерия было выбрано облизывание передней или задней обожженной конечности. Двигательную активность мышей определяли с помощью измерителя активности Animex [5]. Внутрижелудочковую инъекцию проводили через канюлю, имплантированную в правый желудочек.

На рис. 1 показано, что мыши C57, DBA и Свисс различаются по интенсивности вызванного морфином двигательного ответа. В течение первого часа после инъекции морфина увеличение двигательной активности у мышей C57 в семь раз больше, чем у мышей DBA и Свисс. С другой стороны, мет-энкефалин не вызывал увеличения двигательной активности ни у одной из мышей исследуемых линий (рис. 2). Изучение индуцированной морфином анальгезии показало, что анальгезирующий эффект у мышей C57 менее выражен, чем у мышей DBA и Свисс. Действительно, значение ED$_{50}$ для морфина у мышей DBA значительно ниже, чем у мышей линии C57 (табл. 1). Различия в чувствительности к морфину у мышей разных линий обусловлены не различиями во вса-

Таблица 1

Индуцированная морфином анальгезия у мышей различных линий

Линия	Доза, мг/кг	Анальгезия		
		частота, %	ED$_{50}$[1]	доверительный интервал (P=95%)
Свисс	5	25	8,2	(6,4–10,4)
	10	55		
	20	95		
C57BL/6	5	17		
	7,5	33	8,5	(6,0–11,9)
	10	70		
DBA/2	2,5	17		
	5	50	5,0	(3,1—5,9)
	10	75		

[1] ED$_{50}$ выражается как доза (мг/кг) морфина, вводимого за 30 мин внутрибрюшинно.

Таблица 2

Индуцированная мет-энкефалином анальгезия у мышей различных линий[1]

Линия	ED$_{50}$, мкг/мышь	Доверительный интервал (P=95%)	Пик, мин	Продолжительность, мин
Свисс	86,6	61,0—123,0	3—6	15
C57BL/6	110,9	78,1—157,6	3—6	15
DBA/2	35,3	26,3—47,4	3—6	30

[1] Мет-энкефалин растворяли в 10 мкл и вводили в желудочек мозга.

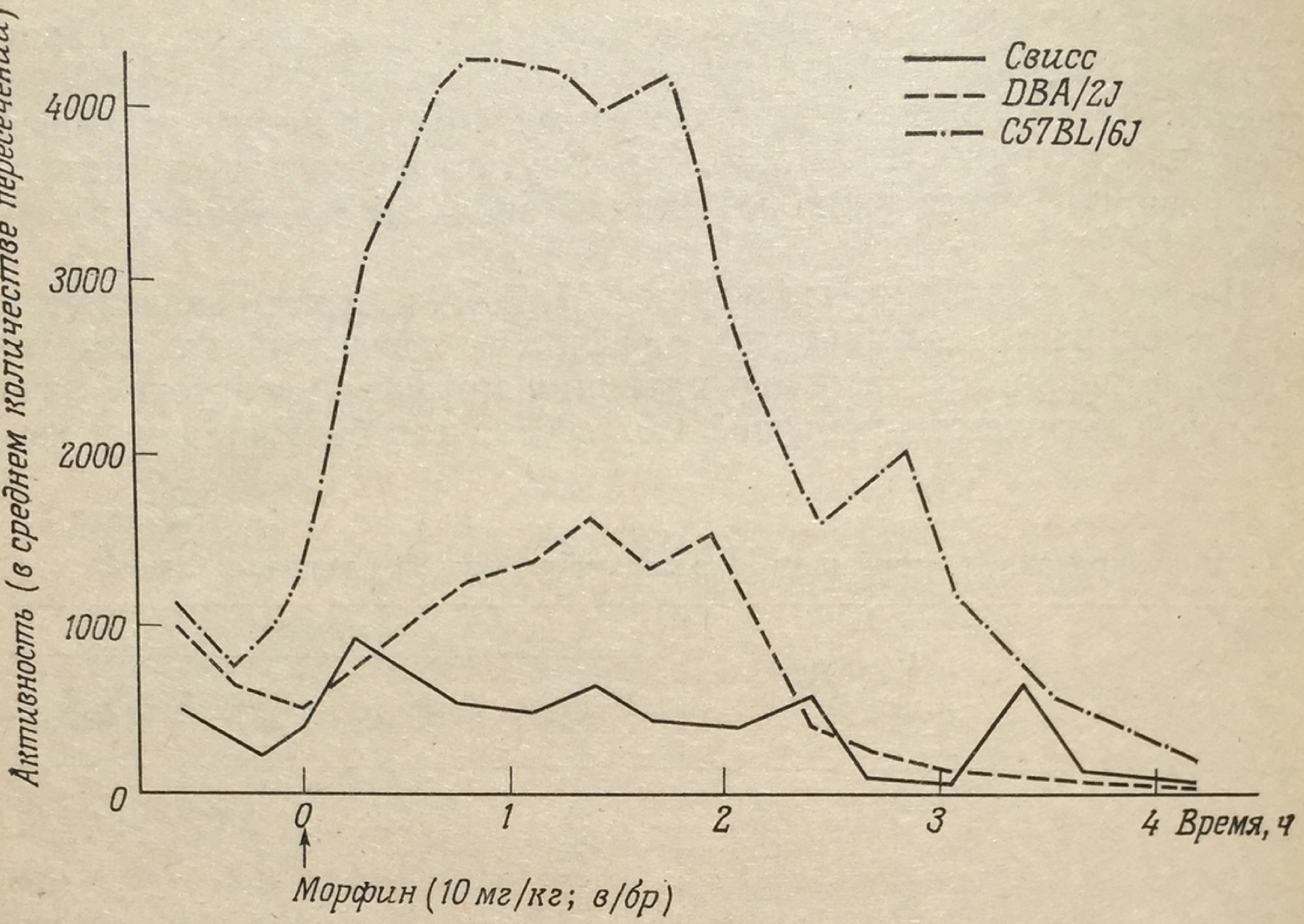


Рис. 1. Влияние морфина (10 мг/кг, внутрибрюшинно) на двигательную активность мышей различных линий. Каждая группа состояла из 20 мышей.

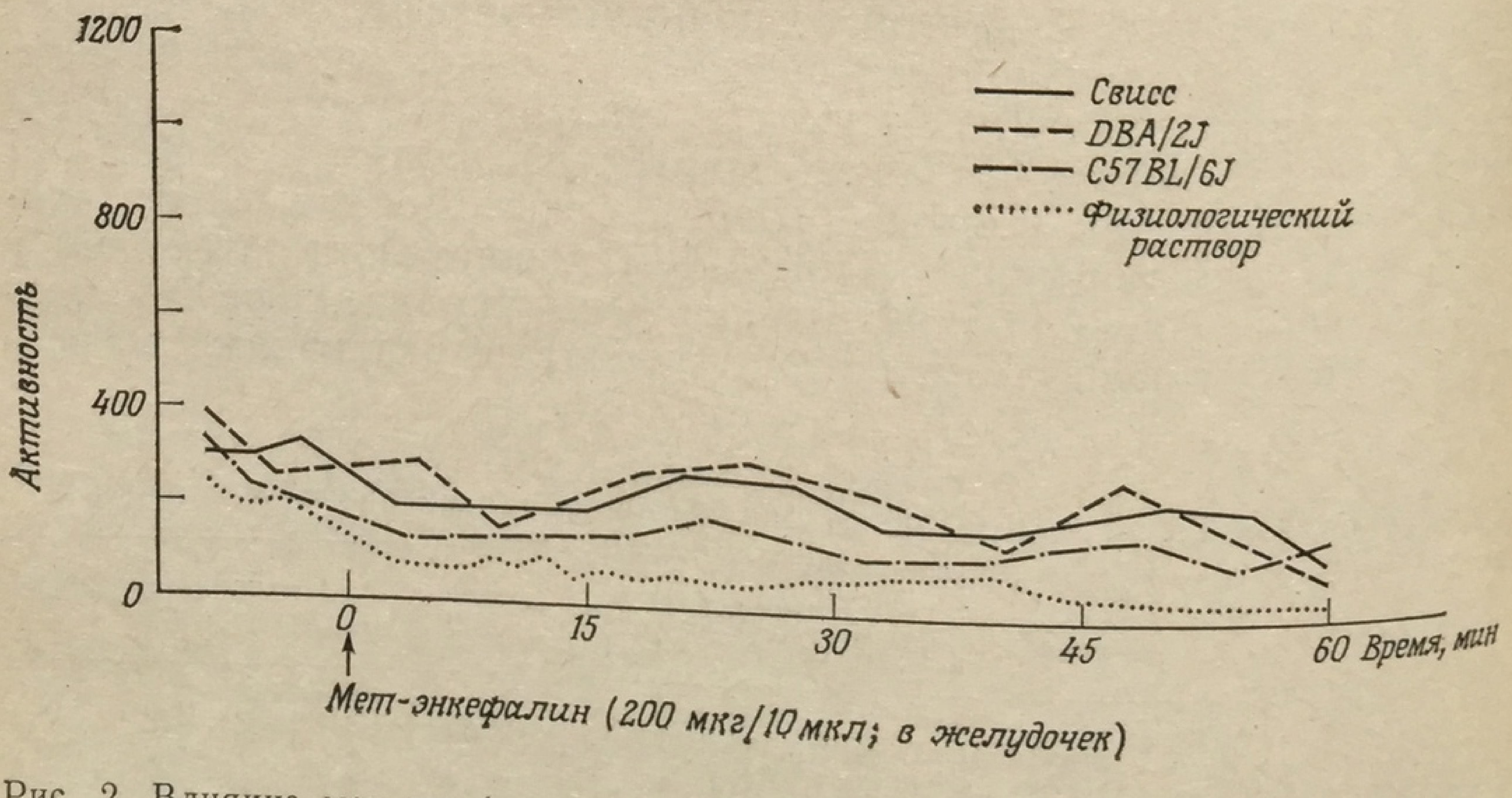


Рис. 2. Влияние мет-энкефалина (200 нг) на двигательную активность мышей различных линий. Каждая группа состояла из 20 мышей. По оси ординат отложена активность в среднем количестве пересечений.

сывании или метаболизме, поскольку такое же анальгезирующее действие и влияние на двигательную активность наблюдались при внутрижелудочковой инъекции морфина (данные не приведены).

Аналогичные различия в анальгезирующей активности обнаружены после инъекций мет-энкефалина, который более эффективен в индукции анальгезии у мышей DBA, чем у мышей линии C57 (табл. 2).

Влияние морфина и мет-энкефалина на изолированный vas deferens мышей C57 и DBA

Изолированный vas deferens мышей представляет собой стандартную модель для оценки наркотических препаратов, поскольку их агонистическая и антагонистическая эффективность в этом препарате тесно коррелирует с эффективностью их действия в центральной нервной системе [6]. Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что подавление морфином сокращений vas deferens, вызванных электрическим раздражением, у мышей DBA проявляется сильнее, чем у мышей C57.

Таблица 3

Влияние морфина на вызванное электрическим раздражением сокращение продольной мышцы vas deferens у двух различных линий мышей

Концентрация морфина, нг/мл	Подавление сокращения, %	
	DBA/2J	C57BL/6J
50	25,3±4,4	11,8±0,8
100	39,9±2,5	20,2±2,2
200	55,8±1,7	32,1±3,0
500	72,9±1,6	48,6±3,1
ID_{25}^{1} (нг/мл)	48,4(47,7—49,1)	122,8(121,6—123,9)

[1] ID_{25} (доверительный интервал 95%) получена путем интерполяции из логарифмической кривой зависимости доза — ответ, построенной методом наименьших квадратов на основании всех полученных экспериментальных данных. Среднее значение 6 измерений±средняя ошибка.

Эти результаты, по-видимому, хорошо коррелируют с анальгезирующей эффективностью морфина у различных линий (табл. 1). Ингибирующее действие мет-энкефалина на сокращение vas deferens у мышей C57 различных линий проявляется сильнее, чем у мышей DBA (табл. 4). Кроме того, мет-энкефалин оказывается в 10 раз более активным, чем морфин, в подавлении сокращений vas deferens у мышей обеих линий.

Таблица 4

Ингибирующее действие мет-энкефалина на вызванное электрическим раздражением сокращение продольной мышцы vas deferens мыши

Линия мышей	ED_{30}[1], нг/мл (доверительный интервал 95%)	Отношение эффективностей
C57BL/6J	6,81(6,72—6,90)	1,97
DBA/2J	13,42(13,19—13,65)	

[1] Значения ED_{30} (доза, необходимая для подавления 30% сокращений в течение 1 мин) получены интерполяцией логарифмической кривой зависимости доза — ответ, построенной методом наименьших квадратов с учетом всех экспериментальных данных.

Налтрексон способен обращать эффекты как морфина, так и мет-энкефалина (табл. 5). Интересно отметить, что действие мет-энкефалина в препаратах vas deferens обеих линий мышей подавляется одинаковыми концентрациями налтрексона. В самом деле (табл. 5) значение K_b выражающее концентрацию налтрексона, вызывающую 50%-ное подавление действия мет-энкефалина, у обеих линий мышей оказывается одного и того же порядка. Кроме того, дозы налтрексона, необходимые для подавления эффекта морфина, оказываются в 10 раз более низкими, чем дозы, необходимые для подавления эффекта мет-энкефалина.

Таблица 5

Ингибирующее действие мет-энкефалина (мет-энк) на вызванное электрическим раздражением сокращение продольных мышц vas deferens у двух различных линий мышей в присутствии налтрексона (НАЛ)

Линия	Соединение (нг/мл)	ED_{30}, нг/мл	Доверительный интервал (P=95%)	ОД[1]	K_i[2]	Отношение эффективностей[3]
C57BL/6J	Мет-энк	6,81	6,72—6,90	—	5,3	1,13
	Мет-энк+НАЛ (6)[4]	15,42	15,32—15,53	2,26		
	Мет-энк+НАЛ (12)[4]	36,71	35,33—38,23	5,39		
DBA/2J	Мет-энк	13,42	13,19—13,65	—	6,01	
	Мет-энк+НАЛ (6)[4]	26,27	26,02—26,52	1,96		
	Мет-энк+НАЛ (12)[4]	102,14	93,52—112,85	7,62		

[1] ОД — отношение доз, представляющее собой отношение значений ED_{30}.

[2] K_1 — концентрация НАЛ, необходимая для подавления активности мет-энкефалина на 50%. Значение K_i выражает дозу антагониста, соответствующую ординате 0 для следующей функции (ОД—1)=а+б (логарифм дозы антагониста) по Фурхаготту [4].

[3] Отношение эффективности представляет собой отношение между ОД. Доза указана для налтрексона.

Влияние мет-энкефалина и морфина на активность чувствительной к дофамину аденилатциклазы в стриатуме

Результаты проведенных недавно исследований показывают, что поведенческие различия между инбредными линиями могут быть обусловлены различными биохимическими механизмами. Биохимические исследования показывают, что дофаминэргические нейроны участвуют в формировании особенностей поведения, вызванных введением морфина [1, 3, 17]. Различные авторы отмечали, что аденилатциклаза — фермент, катализирующий образование циклического АМР, в некоторых тканях играет роль структурного компонента в надмолекулярной организации катехоламинового рецептора [8, 9]. В связи с этим мы исследовали участие дофаминэргических рецепторов в действии морфина и мет-энкефалина у мышей C57 и DBA.

В табл. 6 показано, что мет-энкефалин не влияет на базальную активность чувствительной к дофамину аденилатциклазы в гомогенатах стриатума мышей обеих линий. Действие мет-энкефалина аналогично действию морфина (табл. 6). Более того, мет-энкефалин, как и морфин, не изменяют стимулирующего действия дофамина на этот фермент (табл. 6).

Таблица 6

Влияние мет-энкефалина и морфина на чувствительную к дофамину аденилатциклазу у мышей двух линий[1]

	Количество cAMP, пмоль/мг белка/мин	
	C57BL/6J	DBA/2J
Контроль	232±12	213±8
Дофамин ($5\cdot10^{-5}$ M)	434±13[2]	404±8[2]
Морфин ($5\cdot10^{-5}$ M)	217±6	208±10
Мет-энкефалин ($5\cdot10^{-5}$ M)	228±9	231±11
Дофамин ($5\cdot10^{-5}$ M) + морфин ($5\cdot10^{-5}$ M)	422±9[2]	399±11[2]
Дофамин ($5\cdot10^{-5}$ M) + мет-энкефалин ($5\cdot10^{-5}$ M)	470±12[2]	425±12[2]

[1] Все значения выражены как среднее значение по крайней мере 4 измерений±средняя ошибка.

[2] $p<0{,}01$.

Заключение

Подводя итоги, можно сказать, что при сравнительном изучении фармакологического и биохимического действия морфина и мет-энкефалина in vivo и in vitro установлено следующее.

1. Использование инбредных линий представляется многообещающим направлением в области нейрофармакологии. Генетические механизмы, по-видимому, играют важную роль в определении интенсивности локомоторного и анальгезивного ответов на морфин. В самом деле, увеличение двигательной активности максимально у мышей C57 (рис. 1), а увеличение анальгезивного ответа максимально у мышей DBA (табл. 2).

2. Мет-энкефалин сходен с морфином в плане специфичности анальгезирующего ответа у мышей различных линий (табл. 1 и 2). С другой стороны мет-энкефалин не вызывает увеличения двигательной активности (рис. 2). Эти результаты показывают, что вызванные морфином изменения двигательной активности у мышей контролируются механизмами, отличными от таковых, контролирующих анальгезивный ответ.

3. Дофамин, возможно, участвует в биохимических механизмах, приводящих к развитию гиперактивности. В самом деле, мы недавно показали, что выделение дофамина в стриатуме [15] и активация в стриатуме дофаминовых рецепторов [20] индуцируется морфином только у мышей линии C57, проявляющих наиболее высокую двигательную активность. Кроме того, приведенные в табл. 6 данные о действии мет-энкефалина и морфина на чувствительную к дофамину активность аденилатциклазы позволяют думать, что механизм, с помощью которого морфин увеличивает in vivo содержание циклического АМР, не связан с прямой активацией дофаминовых рецепторов. Более того, эти результаты показывают, что дофаминэргические рецепторы в стриатуме нельзя отождествлять с опиатными рецепторами, хотя, как предполагают Каренци и др. (данное издание), опиатные рецепторы могут быть расположены на дофаминэргических аксонах.

4. Результаты опытов по подавлению морфином вызванного электрическим раздражением сокращения vas deferens у мышей C57 и DBA (табл. 3) хорошо коррелируют со степенью анальгезирующего действия морфина. Однако, как следует из полученных результатов, между эффектами мет-энкефалина in vitro и in vivo в опытах на мышах этих линий корреляции не наблюдается (табл. 4). В настоящее время мы выясняем, не является ли более слабый эффект мет-энкефалина у мышей DBA по сравнению с мышами C57 результатом более быстрой деградации пептида. Возможно, однако, что мыши этих двух линий характеризуются гетерогенным распределением опиатных рецепторов. Некоторые исследователи показали недавно [10, 11], что гомогенаты мозга, подвздошная кишка морской свинки и vas deferens мыши характеризуются наличием опиатных рецепторов. Поскольку мет-энкефалин в 10 раз более активен, чем морфин, в подавлении продольных сокращений vas deferens, вызванных электростимуляцией (табл. 4), и поскольку мет-энкефалин менее чувствителен, чем морфин, к ингибирующему действию налтрексона (табл. 5) [10], мож-

но предположить существование множественных форм опиатных рецепторов. На основании этих наблюдений мы допускаем существование различных рецепторов в vas deferens мышей двух изучаемых линий. Такая возможность в настоящее время исследуется.

Список литературы

1. *Carenzi A., Cheney D. L., Costa E., Guidotti A., Racagni G.* Neuropharmacology, **14**, 927—939 (1975).
2. *Castellano C., Oliverio A.* Psychopharmacologia, **41**, 197—200 (1975).
3. *Clouet D. H., Ratner M.* Science, **168**, 854—856 (1970).
4. *Furchgott B.* In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. XXXIII: Catecholamines, eds. H. Blaschko and E. Muscholl, pp. 306—312, Springer-Verlag (1972).
5. *Goldstein A., Sheehan P.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **169**, 175—184 (1969).
6. *Henderson G., Hughes J., Kosterlitz H. W. Br.* J. Pharmacol., **46**, 764—766 (1972).
7. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.*, Nature, **258**, 577—579 (1975).
8. *Kebabian J. W., Petzold G. L., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 2145—2149 (1972).
9. *Klainer L. M., Chi Y. M., Freidberg S. L., Rall T. W., Sutherland E. W.* J. Biol. Chem., **237**, 1239—1243 (1962).
10. *Lord J. A. M., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, **267**, 495—499 (1977).
11. *Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **197**, 517—532 (1976).
12. *Oliverio A., Castellano C.* Psychopharmacologia, **39**, 13—22 (1974).
13. *Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H.* Life Sci., **16**, 1765—1769 (1975).
14. *Pert A.* In: Opiates and Endogenous opioid peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 87—94, Elsevier (North-Holland) Biomed. Press, Amsterdam, The Netherlands (1976).
15. *Racagni G., Oliverio A., Bruno F., Maggi A., Cattabeni F.* In: Advances in Biochemical Psychopharmacology, vol. 16, eds. E. Costa and G. L. Gessa, pp. 565—570, Raven Press, New York (1977).
16. *Radouco-Thomas C., Garcin F., Mack G., Radouco-Thomas S.* In: Opiates and Endogenous peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 111—120, Elsevier, North-Holland, Biomed. Press, Amsterdam, The Netherlands (1976).
17. *Smith C. B., Sheldon M. I., Bednarczyk J. H., Villarreal J. E.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **180**, 547—557 (1972).
18. *Terenius L., Wahlström A.* Acta Pharmacol., **35**, 55—60 (1974).
19. *Teschemacher H., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1771—1776 (1975).
20. *Trabucchi M., Spano P. F., Racagni G., Oliverio A.* Brain Res., **114**, 536—540 (1976).

ЭНДОРФИНЫ МОЗГА И ОЩУЩЕНИЕ ХОРОШЕГО САМОЧУВСТВИЯ: ПСИХОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА

Л. СТАЙН, Дж. БЕЛЛУЦИ

(L. Stein, J. D. Belluzzi)

> «В своих поступках вы руководствуетесь стремлением добиться наиболее благоприятных для себя последствий. Но почему вы делаете это? Чего вы хотите добиться?
>
> Во всем, что вы делаете со всеми вашими знаниями и проницательностью, вы выбираете путь, который, по вашему мнению, обеспечит вам наилучшее самочувствие и сведет к минимуму душевные волнения. Цель, которую вы при этом преследуете, — это то, что обычно называется *счастьем:* ощущение хорошего самочувствия.
>
> Счастье — это отнюдь не новая автомашина, слава, удачная женитьба, здоровье или теплое одеяло. Это все — лишь вещи... Счастье — это *эмоция,* непроизвольная реакция на то, что случилось с вами.
>
> Чтобы ваше душевное состояние превратилось из несчастливого в счастливое, вам необходимо изменить обстоятельства. И именно это и есть *причина ваших действий* — найти обстоятельства, которые сделают вас счастливее».
>
> *Гарри Браун* (1973)

Предположение о том, что эндорфины мозга могут играть важную роль в психических расстройствах [6, 24], порождает интересный вопрос относительно их нормальной физиологической роли. Концепция, согласно которой опиоидные пептиды [1, 15, 19] служат природными анальгезирующими веществами, регулирующими ответ на боль, по-видимому, верна [2], хотя слишком узка, чтобы объяснять проявление эмоциональных расстройств и психозов. В этом сообщении мы предлагаем расширить приписываемую эндорфинам функцию [3, 8, 12] — распространив ее на регуляцию эмоциональных состояний и инстинктивных побуждений. Говоря точнее, мы предполагаем, что эндорфины могут служить медиаторами или модуляторами в нейронных системах, опосредующих удовлетворение или подкрепление. Мы уже высказывали предположение, что нарушение подкрепления может служить этиологическим фактором в эмоциональных расстройствах и шизофрении [20, 23].

Однако, прежде чем рассмотреть факты, подтверждающие гипотезу об участии эндорфинов в функциях подкрепления, удобно будет выделить два типа подкрепления на поведенческом уровне. Общие наблюдения подтверждают взгляд на подкрепление как на события, усиливающие побуждения (побудительные), а также противоположную точку зрения, согласно которой подкрепление идентично событиям, ослабляющим побуждения (удовлетворяющие) (табл. 1). Хотя события обоих типов могут обеспечивать положительное подкрепление поведения, побудительные события увеличивают уровень активности и возбуждения, а удовлетворяющие события вызывают облегчение и покой. Физиологи сформулировали соответственно теорию «индукции побуждений» при подкреплении, с одной стороны, и теорию «ослабления побуждений» при подкреплении, с другой стороны. В критическом обзоре Берлин [5] делает вывод, что «сохранение этих, видимо, противоположных теоретических позиций в течение столетия убедительно показывает, что обе теории имеют свое рациональное зерно и что окончательный ответ будет найден лишь на основе синтеза этих теорий».

Таблица 1

Фармакологические данные о существовании двух типов подкрепления

Тип подкрепления	Употребляемый наркотический препарат	Поведенческий эффект	Нейрохимический субстрат
Побуждающий	Кокаин А Амфетамин	Увеличение влечения и возбуждения	Катехоламины
Удовлетворяющий	Морфин	Снижение влечения и возбуждения	Опиоидные **пептиды?**

Фармакологические данные также подтверждают, что подкрепление может быть связано как с увеличением, так и со снижением уровней побуждения и возбуждения. Так, и человек, и животные с одинаковой жадностью вводят себе как агенты, усиливающие возбуждение (например, кокаин), так и агенты, снижающие возбуждение (например, морфин). В этой статье мы приведем данные, свидетельствующие о том, что поведение крыс может подкрепляться инъекциями энкефалина непосредственно в желудочки их собственного мозга. Мы представим также три другие линии данных, подтверждающих гипотезу о том, что опиоидные пептиды могут опосредовать подкрепление со снижением побуждений. Прежде всего мы покажем, что сопряженная с ответом электрическая активация богатых энкефалинами участков мозга служит подкреплением в экспериментах по самостимуляции. Во-вторых, мы покажем, что независимые от ответа инъекции энкефалинов подавляют выработанное поведение, поддерживаемое естественным подкреплением, что согласуется с постулированной ролью энкефалинов как соединений, ослабляющих побуждения. И наконец, мы покажем, что инъекция энкефалина обладает свойствами естественного подкрепления в содействии обучению [4].

Самовведение энкефалина

Крысы с постоянно имплантированными внутрижелудочковыми канюлями имели постоянный доступ в течение одного 66-часового теста к раствору одного из препаратов, показанных на рис. 1. Каждое нажатие рычага обеспечивало поступление 1 мкл жидкости в мозг в течение 0,9 с. Каждая крыса испытывалась один раз и имела доступ только к одному из растворов. Обучение нажатию на рычаг не проводилось; крыс просто помещали в скайнеровский бокс с запасом пищи и воды, достаточным для 66-часового периода. Скорости самовведения энкефалинов и морфина (но не структурно родственного тетрапептида Tyr-Gly-Gly-Phe) были выше, чем скорость самовведения раствора Рингера (рис. 1). Порядок предпочтения для пептидов при их испытании в дозах 1 или 10 мкг

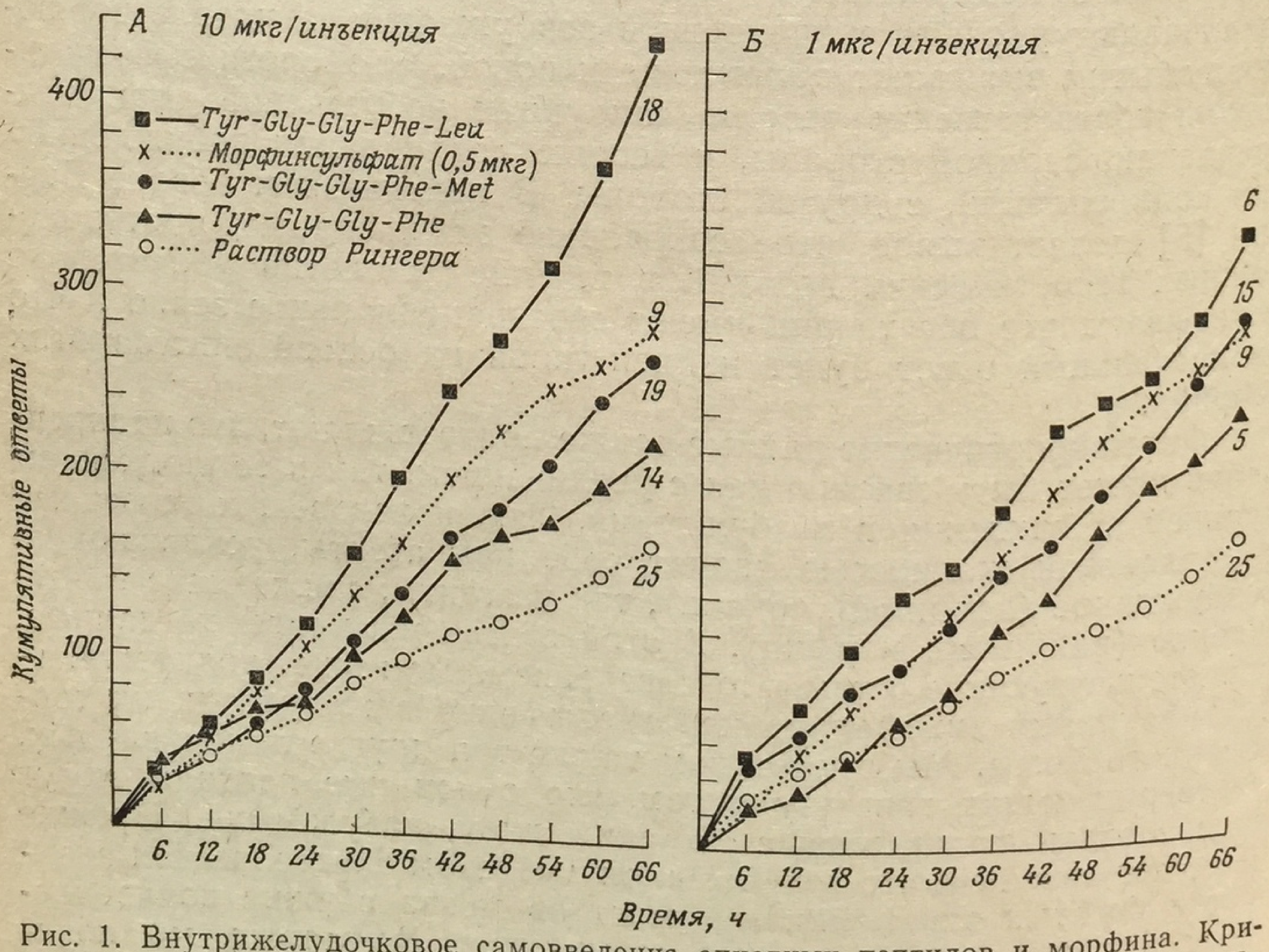


Рис. 1. Внутрижелудочковое самовведение опиатных пептидов и морфина. Кривые показывают среднее число аутоинъекций, накапливающихся в последовательные 6-часовые интервалы в течение всего испытания, продолжающегося 66 ч. Количество крыс в группах указано непосредственно под кривыми.

на инъекцию был следующим: лей-энкефалин>мет-энкефалин>>Tyr-Gly-Gly-Phe. Массивные дозы лей-энкефалина особенно охотно вводили себе лучше респондеры — несмотря на возможность повреждения ткани или других неблагоприятных воздействий, которые могли быть вызваны прохождением большого количества жидкости через желудочки мозга.

Контрольные эксперименты показали, что объяснение высокой скорости ответов в «энкефалиновой» группе неспецифической поведенческой стимуляцией может быть исключено (см. разд. «Подавление энкефалинами поведения, подкрепляемого пищей»); в связи с этим было принято, что поведение крыс отражает морфиноподобное вознаграждение или наркоманическое действие пептидов. Наблюдаемое предпочтение лей-энкефалина мет-энкефалину также согласуется с интерпретацией вознаграждения. Связывание опиатными рецепторами лейциновых пептидов сильнее снижается ионами натрия и сильнее стимулируется ионами марганца, чем связывание метиониновых пептидов [9, 18]. Сходная чувствительность к ионам натрия и марганца отличает обладающие высоконаркотической активностью опиатные агонисты от других классов лекарственных опиатов [18]; следовательно, эти наблюдения могут служить независимым указанием на то, что лей-энкефалин является более чистым опиатным агонистом с более высоким наркотическим и эйфориогенным потенциалом, чем мет-энкефалин.

Было также обнаружено, что дозы обоих пентапептидов в 1 мкг обеспечивают более быстрое обучение самовведению, чем дозы в 10 мкг, но дозы в 10 мкг индуцируют более высокий уровень производительности. В соответствии с этим доза лей-энкефалина 1 мкг обеспечивает более высокую скорость самообучения, чем доза 10 мкг в первые 24 ч после начала эксперимента, но доза 10 мкг обеспечивает более высокую скорость самовведения после продолжительного воздействия пептида (табл. 2). Эти результаты можно объяснить, исходя из возникновения толерантности к подкрепляющему действию лей-энкефалина, как это имеет место в случае морфина. До того как разовьется толерантность, доза

Таблица 2

Доказательство возникновения толерантности при самовведении лейцин-энкефалина

Вводимое вещество	Число крыс	Доза, мкг	Скорость самовведения среднее ±СО	
			первые 24 ч	последние 24 ч
Раствор Рингера	25	—	64,0±10,7	54,7±11,3
Лей-энкефалин	6	1	141,7±29,8 1)	99,7±36,8
	18	10	116,6±43,2	186,9±56,4 2)

1) Достоверно отличается от раствора Рингера, $p<0,005$.
2) $p<0,025$.

пептида 1 мкг на инъекцию обеспечивает удовлетворительное подкрепление, а при дозе 10 мкг происходит передозировка; после развития толерантности доза 10 мкг оказывается ближе к оптимальной, а доза 1 мкг оказывается недостаточной.

Самостимуляция богатых энкефалинами участков мозга

Жадность, с которой животные вводят себе лей-энкефалин, подтверждает идею о том, что вещества, близкие или идентичные энкефалинам, могут служить природными эйфорогенами, или медиаторами подкрепления. Если это предположение верно, то подкрепление или наркомания могут быть вызваны не только введением экзогенных энкефалинов, но также и высвобождением эндогенных пептидов после электрической активации богатых энкефалинами нейронов мозга. Поведенческие [22] и иммуногистохимические [11] наблюдения согласуются с таким предсказанием. Участки мозга, обеспечивающие высокую скорость самостимуляции, и участки, содержащие густую сеть энкефалиноподобной иммунореактивности, часто перекрываются точно в одних и тех же областях мозга (табл. 3). В соответствии с нашей гипотезой самостимуляция этих участков должна зависеть, по крайней мере частично, от электрически индуцированного высвобождения энкефалинов и последующей активации опиатных «подкрепляющих» рецепторов. Однако участки мозга, богатые энкефалинами, содержат также и высокие концентрации катехоламинов [25], которые, как ранее было показано, участвуют в механизмах самостимуляции [22]. Следовательно, вполне возможно, что именно катехоламины, а не энкефалины ответственны за подкрепление стимуляции мозга.

Таблица 3

Содержание катехоламинов в богатых энкефалином участках самостимуляции [25]

Участок	Концентрация белка, пг/мг	
	норадреналин	дофамин
Центральное серое вещество среднего мозга		
Вентральная часть	24,5	3,9
Substantia nigra	11,7	5,4
Ложевое ядро концевой полоски	27,2	19,1
Аккумбентное ядро	9,3	87,2

Если самостимуляция зависит от активации опиатных рецепторов электрически высвобождаемыми энкефалинами, то поведение должно быть подавлено или погашено после введения антагониста опиатных рецепторов, такого, как налоксон. С другой стороны, если подкрепление поведения зависит только от высвобождения катехоламинов, то налоксон должен быть неэффективен и только блокаторы катехоламинэргических рецепторов и ингибиторы синтеза катехоламинов должны подавлять самостимуляцию. Для начального фармакологического тестирования был выбран центральный серый участок, поскольку электрическая стимуляция этого участка индуцирует выраженную анальгезию и высокую скорость самостимуляции [16]. Различные дозы налоксона вводили с недельным интервалом непосредственно перед испытанием, и в последующих испытаниях ингибитор синтеза норадреналина, диэтилдитиокарбамат, вводили за 1 ч до начала опыта. Введение обоих агентов приводило к зависящему от дозы снижению скорости самостимуляции (рис. 2). Эти результаты показывают, что самостимуляция центрального серого вещества зависит от активации как энкефалинэргических, так и норадренэргических нейронов. Изучение внутривенного самовведения морфина также подтверж-

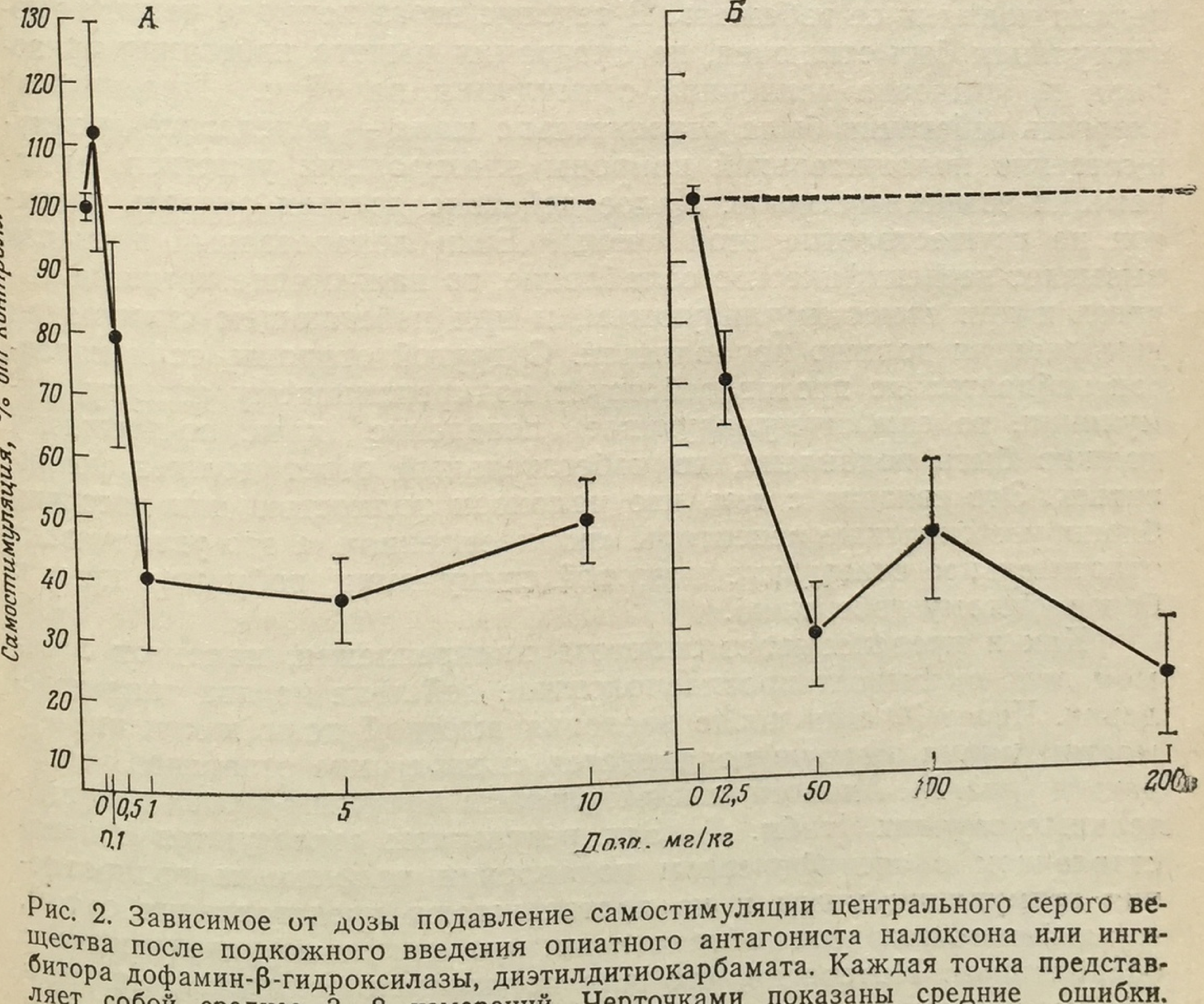


Рис. 2. Зависимое от дозы подавление самостимуляции центрального серого вещества после подкожного введения опиатного антагониста налоксона или ингибитора дофамин-β-гидроксилазы, диэтилдитиокарбамата. Каждая точка представляет собой среднее 3—8 измерений. Черточками показаны средние ошибки. *А* — налоксон, *Б* — диэтилдитиокарбамат.

дает участие норадренэргических механизмов в опиатном подкреплении [10, 17].

Возможно, однако, что подавление налоксоном самостимуляции центрального серого вещества обусловлено неспецифическим действием лекарственного препарата, а не его действием на процессы подкрепления. Прямые наблюдения не выявили каких-либо седативных или ослабляющих эффектов даже при более высоких дозах налоксона, но легко представить себе, что поведение может быть неспецифически подавлено какими-либо другими, неизвестными нам способами.

Чтобы проверить такую возможность, крыс обучали по двухкомпонентной программе стимулирования мозга в двухрычаговом скайнеровском боксе. Программа включала в себя компоненты самостимуляции и избегания, чередующиеся каждые 5 мин [13]. В первом компоненте крысы нажимали один рычаг по обычной схеме самостимуляции; рычаг избегания был отключен. При втором компоненте те же мозговые стимулы поступали автоматически с частотой 1 имп./сек; при нескольких электродных участках такая усиленная стимуляция вызывает некоторые неудобства, и крысы делали попытки ее избежать. В течение этого периода рычаг самостимуляции был отключен, но активация рычага избегания приводила к остановке усиленной стимуляции на 5 с. Практически скорость избегания была относительно мала — вследствие преимущественно положительной природы электродных участков, вызывающих самостимуляцию. Какое действие должен оказать налоксон на осуществление этой схемы? Если лекарственый препарат вызывает неспецифическое ослабление, то нажимание крысами рычагов и при самостимулирующем, и при избегающем стимуляции компонентах должно подавляться. С другой стороны, если налоксон избирательно противодействует подкрепляющему аспекту стимуляции, то самостимулирующее поведение крыс по-прежнему должно быть подавлено, но избегательный ответ должен усиливаться. Это связано с тем, что налоксон полностью или частично блокирует опиатные рецепторы «подкрепления», а это увеличивает относительное отвергание мозговой стимуляции, побуждая крыс к более частому избеганию.

Как и предсказывает гипотеза подкрепления, налоксон в самом деле оказывает противоположное действие на два типа поведения. Через 30 мин после введения высокой дозы налоксона самостимуляция заметно подавляется, а избегание отчетливо усиливается (рис. 3). Аналогичные результаты получены в трех дополнительных случаях (табл. 4). Эти результаты согласуются с представлением о специфическом подавлении налоксоном подкрепления стимуляции мозга и не подтверждают представления о том, что действие налоксона обусловлено исключительно успокоением и ослаблением. Интересно, что для подавления самостимуляции в двухкомпонентном тесте требуются более высокие дозы налоксона,

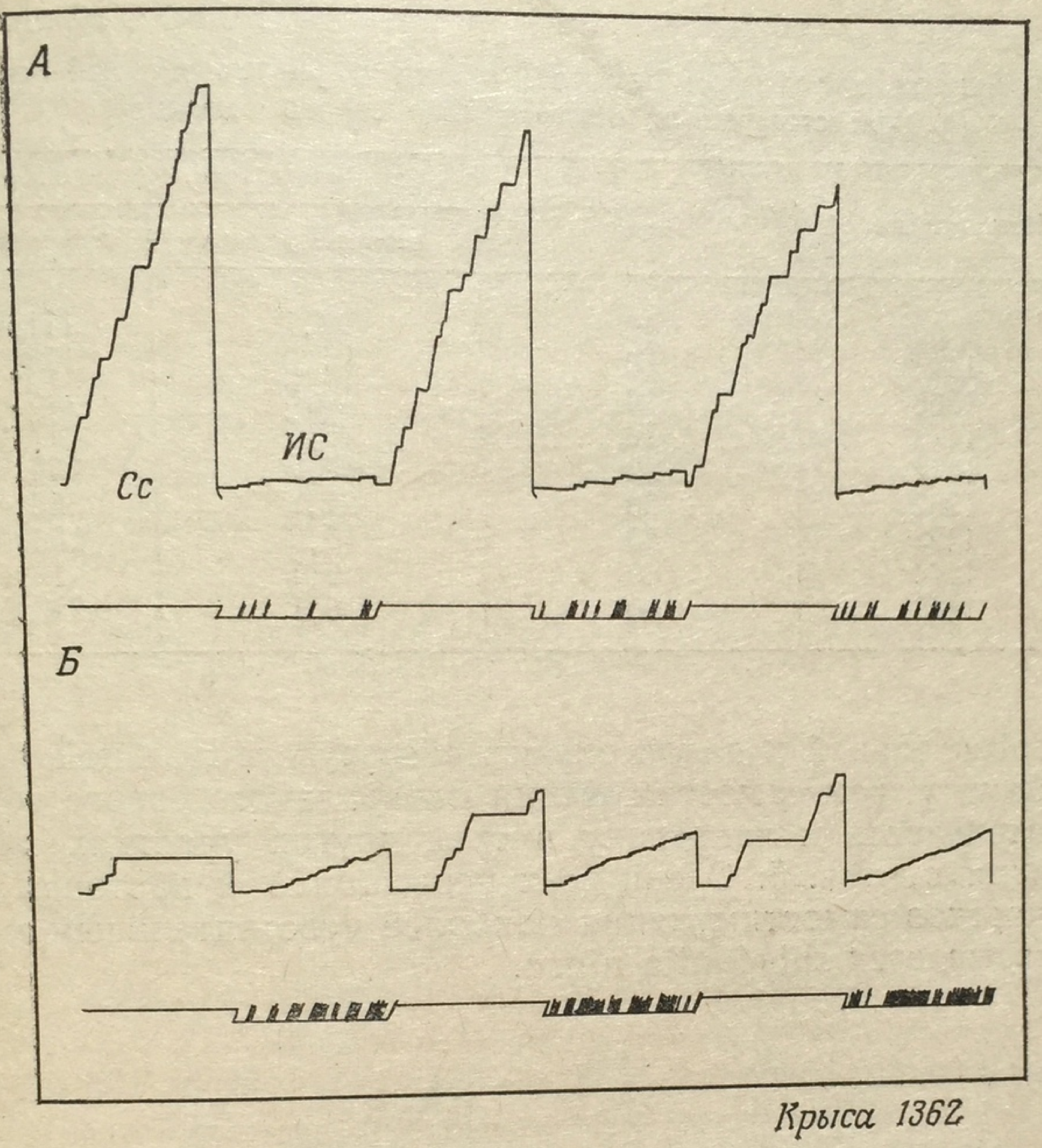


Рис. 3. Двухкомпонентная программа самостимуляции мозга. Верхние графики на рис. *А* и *Б* показывают кумулятивные ответы при чередующихся 5-минутных периодах самостимуляции (Сс) и избегания стимуляции (ИС). Мелкие черточки на нижних графиках в *А* и *Б* также указывают на реакцию избегания. Подавление самостимуляции налоксоном не обусловлено неспецифической слабостью, поскольку реакция избегания усиливается. *А* — контроль, *Б* — налоксон (20 мг/кг).

чем в случае условной самостимуляции (рис. 2). Можно думать, что эндорфины, выделяющиеся в результате усиленной стимуляции в двухкомпонентном тесте, могут противодействовать подавляющему действию налоксона.

Изучали также влияние налоксона на самостимуляцию в ряде других подкрепляющих участков мозга. Особый интерес представляет участок перегородки, поскольку Хёкфельт и сотр. [14] обнаружили четко очерченную группу энкефалин-иммунореактивных тел нейронов в этом участке. Как и в случае самостимуляции центрального серого вещества, налоксон и диэтилтиокарбамат вызывают пропорционально дозе снижение самостимуляции перегородки (рис. 4). Однако самостимуляция перегородки оказывается бо-

Таблица 4

Снижение налоксоном самостимуляции и увеличение избегания при стимуляции центрального серого вещества

Номер крысы	Доза налоксона, мг/кг	Скорость ответа, % от контроля	
		самостимуляция	избегание
1362	10	98,7	111,4
1424	10	91,0	113,6
1366	10	55,8	158,3
1423	10	32,6	17,8
1424	20	91,6	205,9
1362	20	21,2	356,4
1423	20	0,2	258,6
1424	40	0,1	12,4
1423	40	0,1	223,5

лее чувствительной к налоксону и менее чувствительной к диэтилтиокарбамату, чем самостимуляция центрального серого вещества. Чувствительность к налоксону в трех других участках проиллюстрирована в табл. 5. Среди всех испытанных к настоящему времени участков самостимуляции наиболее чувствительным к налоксону оказывается substantia nigra.

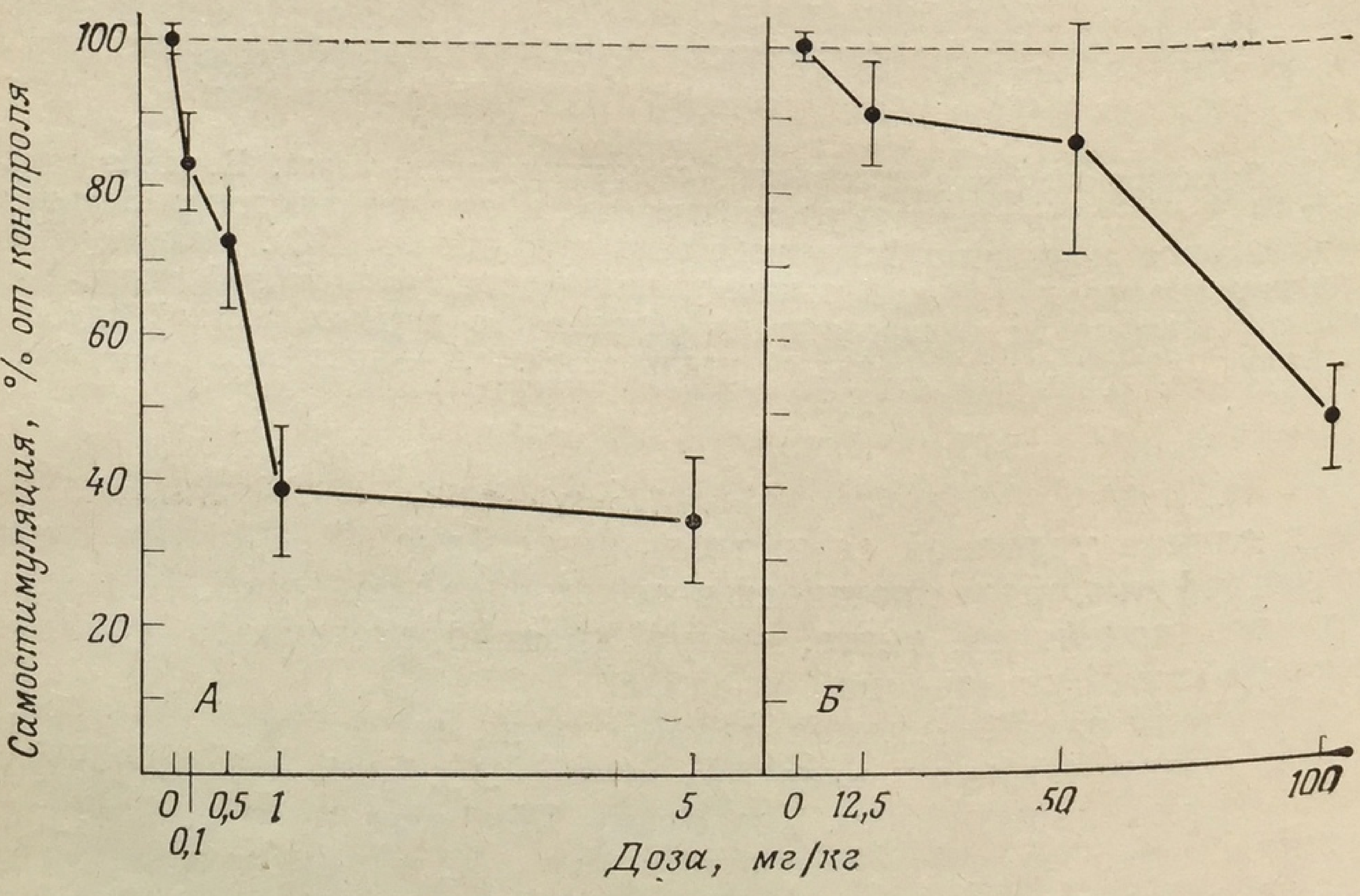


Рис. 2. Зависимое от дозы подавление самостимуляции центрального серого вещества кожного введения налоксона (*А*) или диэтилдитиокарбамата (*Б*). Каждая точка представляет собой среднее значение 3—5 наблюдений. Черточками обозначены средние ошибки.

Таблица 5

Индуцированное налоксоном подавление самостимуляции различных участков мозга

Участок расположения электродов	Число крыс	Доза для 50%-ного подавления, 1) мг/кг (среднее ±СО)
Медиальный пучок переднего мозга	16	5,83±1,66
Locus coeruleus	10	3,33±2,08
Substantia nigra	10	0,48±0,13 2)

1) Налоксон вводили подкожно (диапазон доз 0,04—20 мг/кг) перед ежедневным 1-часовым сеансом самостимуляции. Скорость самостимуляции в присутствии налоксона выражали в процентах от среднего значения скоростей двух предшествующих сеансов контрольной самостимуляции.

2) $p<0{,}02$ по сравнению с группой крыс со стимуляцией медиального пучка переднего мозга.

Убедительным доказательством того, что самостимуляция может зависеть от высвобождения энкефалинов, могла бы служить идентификация новых участков самостимуляции на основе картирования энкефалинов. Поскольку мозг тщательно картирован в отношении самостимуляции, выявление новых участков подкрепления представляет собой нелегкую задачу. Большинство участков

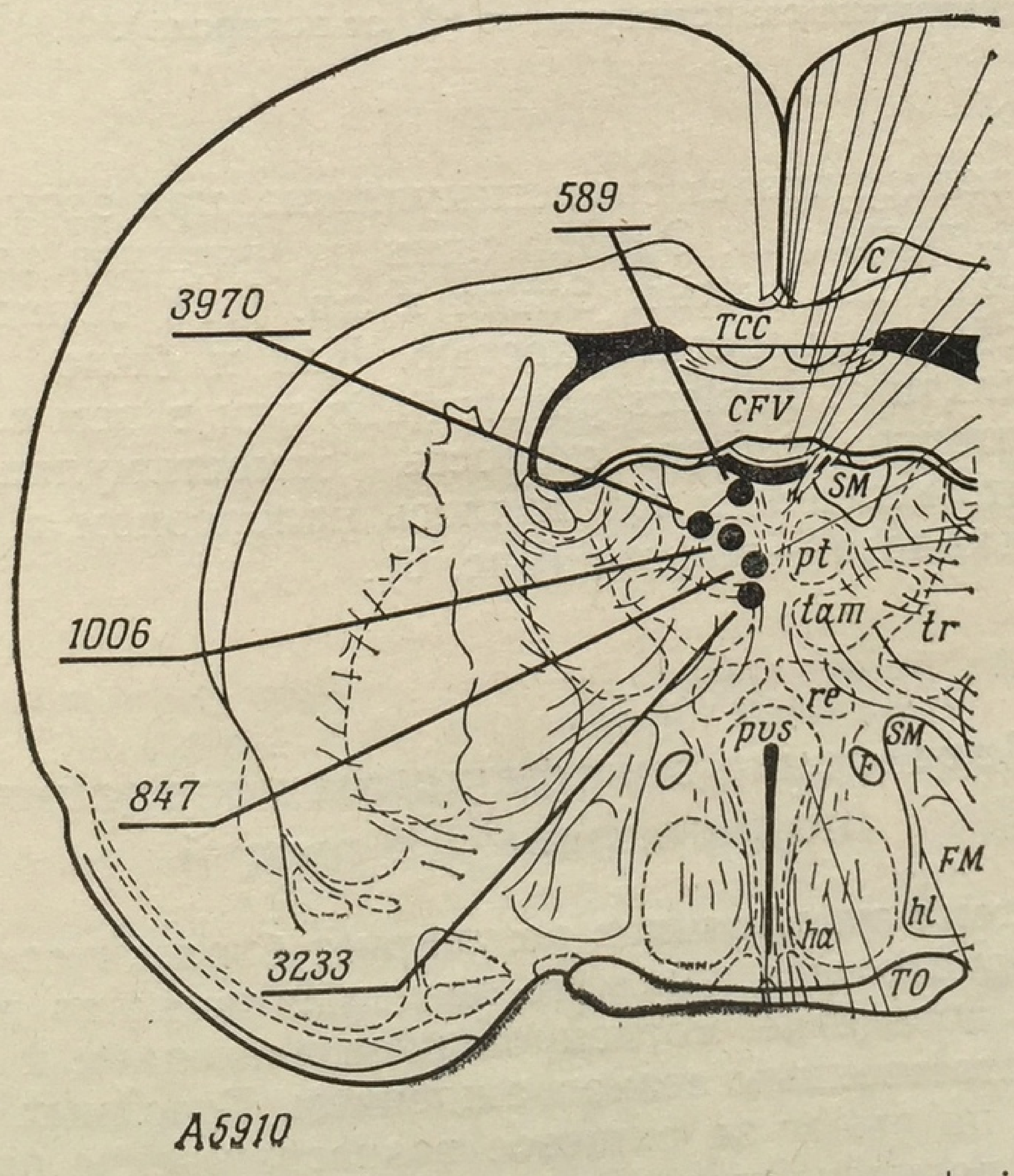


Рис. 5. Положение кончиков пяти электродов в nucleus paratenialis или вблизи него. Цифры указывают максимальную скорость самостимуляции для каждого положения.

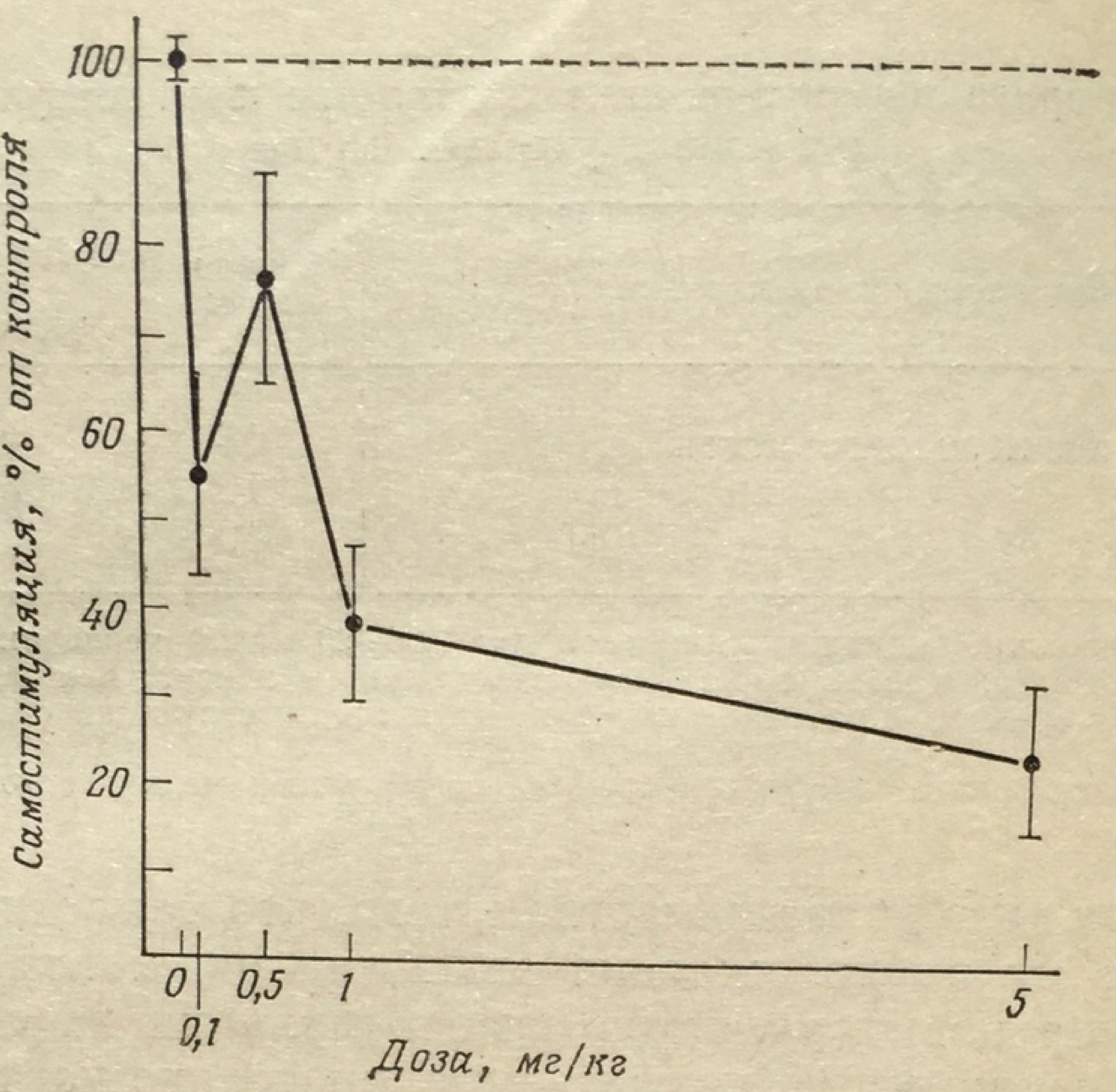


Рис. 6. Зависимое от дозы подавление самостимуляции nucleus paratenialis после подкожного введения налоксона. Каждая точка представляет собой среднее значение 4—5 измерений. Вертикальные черточки показывает средние ошибки. По оси ординат отложена самостимуляция (% от контроля).

таламуса не поддерживает самостимуляцию, при этом такие участки бедны энкефалинами. Однако один из участков таламуса, nucleus paratenialis, по данным Эльда и др. [11], обладает высокой энкефалиновой иммунореактивностью. Как и было предсказано, пять точек вблизи от nucleus paratenialis или в нем самом обеспечивают достаточно высокую скорость самостимуляции (рис. 5). Более того, это поведение подавлялось налоксоном в соответствии с зависимостью доза — эффект (рис. 6).

Подавление энкефалином поведения, подкрепляемого пищей

Если система энкефалинов регулирует биологические стимулы, как было предположено ранее, то введение пептидов должно было бы подавлять поведение, мотивированное влечением к пище и подкрепленное естественным вознаграждением. Голодных крыс обучали нажимать на рычаг за пищевое вознаграждение по схеме апериодического подкрепления. Как и было предсказано, внутрижелудочковое введение мет- или лей-энкефалина (от 50 до 200 мкг) вызывает заметное снижение отработанного поведения (табл. 6).

Таблица 6

Ингибирующее действие энкефалина на поведение животных, поддерживаемых на пищевом подкреплении[1]

Вводимое вещество	Доза, мкг	Число крыс	Скорость нажатия на рычаг относительно контрольных крыс, %
Раствор Рингера	—	4	125,5±23,4
Мет-энкефалин	50	4	57,6±25,6
	100	4	46,1±35,9
Лей-энкефалин	100	8	57,8±16,1[2]
	200	2	39,8±39,5

[1] Ответ нажатием рычага подкреплялся по схеме 2-минутного предоставления подслащенного молока через произвольные интервалы времени. Пептиды растворяли в 10 мкл раствора Рингера и инъецировали в латеральный желудочек мозга непосредственно перед 72-минутным тестом на пищевое подкрепление.

[2] $p < 0{,}005$ по сравнению с группой, получавшей раствор Рингера.

Усиление энкефалинами долговременной памяти

Как указывалось выше, о роли энкефалинов в опосредовании подкрепления поведения свидетельствует несколько линий доказательств: 1) инъекции энкефалинов в мозг служат подкреплением для самовведения, 2) электростимуляция многих богатых энкефалинами участков поддерживает высокую скорость самостимуляции и 3) такое подкрепление стимуляции мозга может быть блокировано низкими дозами налоксона. Важная роль подкрепления в обучении и формировании долговременной памяти не вызывает сомнения, хотя теоретическое обоснование этого феномена во многом противоречиво. В соответствии с этим в задаче с однократной пробой морфин или энкефалин вводили сразу после обучения, с тем чтобы усилить долговременное запоминание выученного ответа. У крыс с постоянно имплантированной внутрижелудочковой

Таблица 7

Влияние введения морфина или энкефалина после обучения на формирование долговременной памяти

Вводимое вещество	Доза, мкг	Число крыс	Время забывания, с среднее ±СО)
Раствор Рингера	—	17	36,23±9,37
Морфин	20	19	78,24±12,14[1]
Морфин (без шока)	20	8	5,75±0,94[2]
Морфин (через 15 мин после шока)	20	7	39,50±23,70
Лей-энкефалин	200	8	47,04±19,71
Мет-энкефалин	200	10	114,25±27,74[1]

[1] $p < 0{,}02$ по сравнению с группой, получавшей раствор Рингера.

[2] $p < 0{,}001$ по сравнению с группой, получавшей морфин.

канюлей вызывали умеренный болевой шок после спрыгивания с полочки на пол клетки [21]. Различные группы крыс получали внутрижелудочковые инъекции либо сразу, либо спустя 15 мин после шока, как показано в табл. 7. Спустя три дня долговременная память о шоке (выражающаяся в продолжительном избегании спрыгивания) измерялась в тесте на удержание. Достоверное усиление выученного ответа наблюдалось в группах крыс, получавших сразу после шока инъекции мет-энкефалина или морфина. Два дополнительных наблюдения подтверждают, что такое действие опиатов на удержание в самом деле обусловлены усилением памяти о шоке. Во-первых, если шок отсутствовал в день обучения (так что памяти о нем не могло быть), то введение морфина не оказывало эффекта (табл. 7). Во-вторых, запаздывание введения морфина всего на 15 мин после шока (но вне предполагаемого периода консолидации памяти) полностью предотвращает эффект усиления памяти. Взятые в совокупности, эти результаты позволяют предположить, что активация опиатных (энкефалиновых) рецепторов после обучения может усиливать консолидацию памяти.

⁂

Приносим большую благодарность Уильяму Карминту, Герману Моррису и Альфреду Шропшайру за добросовестную техническую помощь.

Список литературы

1. *Akil H., Liebeskind J. C.* Brain Res., **94**, 279—296 (1975).
2. *Belluzzi J. D., Grant N., Garsky V., Sarantakis D., Wise C. D., Stein L.* Nature, **260**, 625—626 (1976).
3. *Belluzzi J. D., Stein L.* Nature, **266**, 556—558 (1977).
4. *Belluzzi J. D., Stein L.* Soc. Neurosci. Abstr., 3, 230 (1977).
5. *Berlyne D. D.* In: Pleasure, Reward, Preference, eds. D. E. Berlyne and K. B. Madsen, p. 1, Academic Press, New York (1973).
6. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
7. *Browne H.* How I Found Freedom in an Unfree World, Macmillan, New York (1973).
8. *Byck R.* Lancet, ii, 72—73 (1976).
9. *Chang J.-K., Fong B. T. N., Pert A., Pert C.* Life Sci., **18**, 1473—1482 (1976).
10. *Davis W. M., Smith S. G., Khalsa J. H.* Pharmac. Biochem. Behav., 3, 477—484 (1975).
11. *Elde R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
12. *Goldstein A.* Science, **193**, 1081—1086 (1976).
13. *Hoebel B. G., Thompson R. D.* J. comp. physiol. Psychol., **68**, 536—543 (1969).
14. *Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Stein L.* Neurosci. Lett., 5, 25—31 (1977).
15. *Kosterlitz H. W., Hughes J.* Life Sci., **17**, 91—96 (1975).
16. *Mayer D. J., Wolfe T. L., Akil H., Carder B., Liebskind J. C.* Science, **174**, 1351—1354 (1971).

17. *Pozuelo J., Kerr F. W. L.* Mayo Clin. Proc., **47**, 621—628 (1972).
18. *Simantov R., Snyder S. H.* Life Sci., **18**, 781—788 (1976).
19. *Snyder S. H.* Nature, **257**, 185—189 (1975).
20. *Stein L.* In: Recent Advances in Biological Psychiatry, vol. 4, ed. J. Wortis, pp. 288—308, Plenum Press, New York, (1962).
21. *Stein L., Belluzzi J. D., Wise C. D.* Brain Res., **84**, 329—335 (1975).
22. *Stein L., Belluzzi J. D., Wise C. D.* In: Brain-Stimulation Reward, eds. A. Wauquier and E. T. Rolls, pp. 297—331, North-Holland, Amsterdam (1976).
23. *Stein L., Wise C. D.* Science, **171**, 1032—1036 (1971).
24. *Terenius L., Wahlstrom A., Lindstrom L., Widerlov E.* Neurosci. Lett., 3, 157—162 (1976).
25. *Versteeg D. H. G., van DerGugten J., DeJong W., Palkovits M.* Brain Res., **113**, 563—574 (1976).

ХАРАКТЕРИСТИКА ОПИАТОПОДОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КРОВИ И МОЧЕ

М. ВЮСТЕР, П. ЛОТ, Р. ШУЛЬЦ

(M. Wüster, P. Loth, R. Schulz)

Неизвестные вплоть до последнего времени вещества, обладающие опиатоподобной активностью на электрически стимулируемой подвздошной кишке морской свинки, в изолированном vas deferens мыши и в радиорецепторном тесте, были обнаружены в крови [8], тонком кишечнике [8], моче [7] и мозгу (неопубликованные результаты). Предварительные исследования показали, что все эти соединения обладают рядом общих свойств — это высокая растворимость в липидах, медленное включение и выключение действия в препаратах подвздошной кишки морской свинки и резистентность к проназе. В некотором отношении эти вещества сходны с экстрагируемым из крови [5] эндорфином, анодинином, и отличаются от известных опиоидных пептидов. В данном сообщении приведены результаты дальнейшего изучения свойств соединений, выделенных из крови и мочи человека.

Принимая во внимание липофильную природу этих неизвестных веществ, мы экстрагировали сыворотку и мочу смесью хлороформ/метанол по методу Фолча и др. [1], обеспечивающему отделение липидов от других биологических компонентов тканей. Как правило, 20 мл сыворотки или мочи экстрагировали 400 мл смесью хлороформ/метанол (2 : 1 по объему), постоянно перемешивая в течение 30 мин. После этого смесь фильтровали и фильтрат промывали 80 мл воды. После разделения двух фаз центрифугированием верхнюю фазу отбрасывали. Нижнюю фазу выпаривали досуха и остаток испытывали на опиатоподобную активность, используя биопробу на подвздошной кишке морской свинки [6].

При анализе обладающего опиоидной активностью неочищенного экстракта сыворотки методом тонкослойной хроматографии (ТСХ, силикагель, раствор: 2-пропанол/вода, 7 : 3 по объему) опиатоподобная активность выявлялась между фракциями с R_f 0,8 и 0,9, что соответствовало недавно обнаруженному быстро мигрирующему фактору [8]. Иногда выявлялись следы обладающего опиатоподобным действием материала с R_f 0,2. Поскольку подавляющая часть материала, экстрагируемого смесью хлороформ/метанол (2 : 1) мигрирует при ТСХ в виде одного пика, дальнейшие эксперименты проводились с неочищенным экстрактом сыворотки («экстракт Фолча»).

Экстракция мочи смесью хлороформ/метанол приводит к выделению материала, который не только обладает опиоидной активностью, но содержит также примеси, обладающие значительной возбуждающей активностью. В связи с этим для снижения содержания примесей мочу обрабатывали по методу, описанному ранее [7]. Обычно препарат мочи (50 мл) смешивали с 200 мл смеси гептан/хлороформ (1 : 1 по объему). Органическую фазу выпаривали досуха и наносили на колонку с сефадексом LH-20 (2×3 см), уравновешенную смесью гептан/хлороформ (1 : 1 по объему). Опиоидную активность элюировали с колонки 50 мл смеси гептан/хлороформ (1 : 1). При дальнейшем фракционировании элюата на колонке с силикагелем (готовая фирменная колонка Lobar A, Мерк, Дармштадт) опиоидная активность обнаруживалась в трех пиках (активность, элюируемая смесью хлороформ/метанол — 98 : 2). Поскольку большая часть опиоидной активности оказывалась в одном пике, дальнейшие эксперименты проводились с материалом, элюированным с колонки с сефадексом LH=20.

И экстракт сыворотки, и экстракт мочи, так же как и мет-энкефалин и β-эндорфин, испытывались на вызываемое ими характерное подавление продольного сокращения препарата межмышечного сплетения подвздошной кишки морской свинки. Как показано на рис. 1, и мет-энкефалин, и β-эндорфин характеризуются быстрым проявлением действия (*А* и *Б* на рис. 1). Наоборот, «экстракт Фолча» сыворотки (*В*) и экстракт мочи (*Г*) характеризуются медленным проявлением ингибирующего действия. Очевидно, что «экстракт Фолча» не обладает стойким ингибирующим действием, которое лишь слегка обращается при многократном промывании, как это было установлено в случае неочищенного бутанольного экстракта сыворотки [8]. Тем не менее, как указывают Костерлиц и др. [2] в отношении наркотических анальгезирующих средств, медленное проявление действия свидетельствует о высокой липофильности. Дополнительные испытания обоих экстрактов на изолированных vas deferens мышей подтвердили, что этот препарат обладает более низкой чувствительностью к исследуемым веществам, чем подвздошная кишка морской свинки [7, 8]. В этом отношении исследуемые вещества отличаются от опиоидных пептидов, которые более эффективны в препаратах vas deferens, чем в подвздошной кишке [4].

Для дальнейшего изучения свойств экстрактов крови и мочи их инкубировали с различными ферментами. Как показано в табл. 1, проназа Р полностью подавляет опиатоподобную активность мет-энкефалина и β-эндорфина, но не изменяет активности сывороточного «экстракта Фолча» и экстракта мочи. Трипсин,

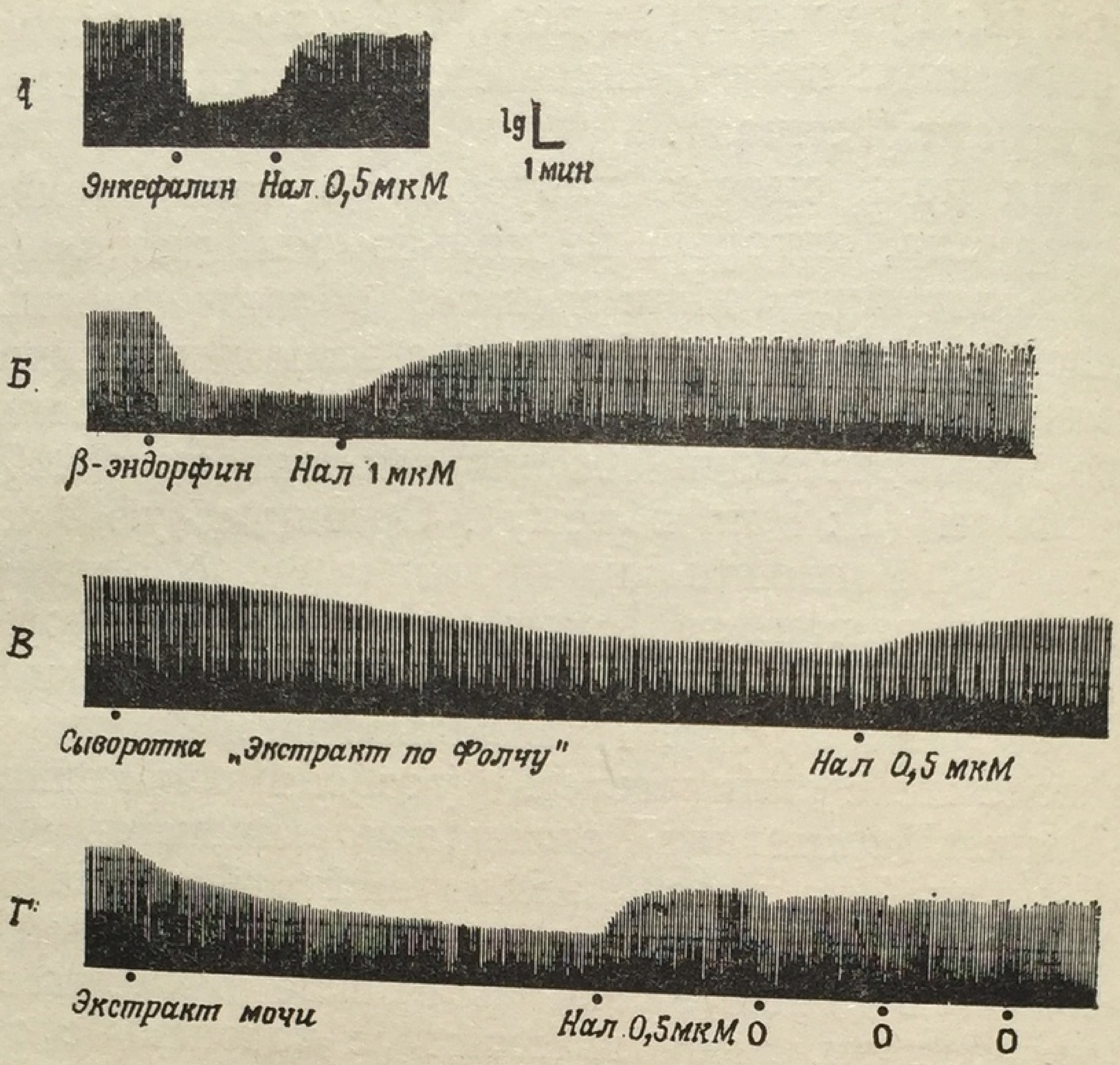


Рис. 1. Опиатоподобное действие мет-энкефалина *(А)*, β-эндорфина *(Б)*, экстракта сыворотки по Фолчу *(В)* и экстракта мочи *(Г)* на подвздошную кишку морской свинки. Налоксон (Нал) противодействует ингибиторной активности. О — отмывка.

β-глюкуронидаза/сульфотрансфераза и уриказа не влияют на активность ни одного из исследованных опиоидных материалов.

Неспособность проназы разрушить опиоидную активность экстрактов крови и мочи побудила нас исследовать резистентность интересующих нас веществ к воздействию кислотой (5 н. HCl, 100 °C). После 1 ч гидролиза в HCl биологическая активность мет-энкефалина подавляется полностью, а активность β-эндорфина — почти полностью (табл. 2). В противовес этому инкубация «экстракта Фолча» или экстракта мочи с HCl в течение 3 ч вызывает лишь слабую потерю опиоидной активности. Исследуемые вещества сохраняют свое характерное медленное проявление активности в изолированной подвздошной кишке. При этом обработка HCl не делает эти вещества чувствительными к действию проназы. Тем не менее гидролиз в течение 18 ч приводит к полной потере опиоидной активности.

При испытании многочисленных препаратов от различных пациентов были выявлены значительные вариации в содержании экстрагируемой опиатоподобной активности в сыворотке [8] и, как было показано в дальнейшем, в моче. Хотя в некоторых случаях в сыворотке не обнаруживается экстрагируемой опиоидной активности, а обычно концентрация опиоидов оказывается в наномолярном диапазоне, наиболее высокие определяемые активности экви-

Таблица 1

Влияние ферментов на опиоидную активность[1]

	Мет-энкефалин	β-Эндорфин	Экстракт сыворотки по Фолчу	Экстракт мочи
Проназа[2]				
5 мкг, 0,5 ч	+	+	—	—
50 мкг, 0,5 ч	+	+	—	—
50 мкг 3 ч	+	+	—	—
Трипсин[3]				
5 мкг, 1 ч	—	—	—	—
β-Гиалуронидаза[4]/арилсульфатаза[5]				
1 мкл, 0,5 ч	—	—	—	—
10 мкл, 0,5 ч	—	—	—	—
Уриказа[6]				
20 мкг, 0,5 ч	—	—	—	—

[1] + означает полную потерю опиоидной активности при тестировании на препарате подвздошной кишки морской свинки; — означает, что потери опиоидной активности не наблюдается. Данные по 3—4 экспериментам.

[2] Доза 6 ед/мг.

[3] Доза 33 е/мг.

[4] Доза 5,2 ед/мл.

[5] Доза 2,6 ед/мл.

[6] Доза 6 ед/мг.

валентны 2 мкМ норморфина, что даже выше, чем обнаруженная в крови активность анодинина [5]. Предполагая, что концентрация анодинина в интерстициальной жидкости у участков опиатных рецепторов находится в равновесии с таковой в сыворотке, Перт и др. [5] заключили, что значительная часть периферических опиатных рецепторов должна быть насыщена. Если концентрация анодинина в сыворотке соответствует 2 мкМ норморфину, эти рецепторы могут быть даже полностью насыщены, при условии что доступ этих веществ не ограничен. В связи с этим были поставлены

Таблица 2

Процент потери эндорфинами биологической активности[1] **при гидролизе**[2]

Препарат	Время инкубации, ч		
	1	3	18
Мет-энкефалин	100	—	—
β-Эндорфин	95	95	100
Экстракт сыворотки по Фолчу	0	10	100
Экстракт мочи	0	15	100

[1] $10 \times ED_{50}$, оцениваемая на препарате подвздошной кишки морской свинки.

[2] 5 н. HCl, 100 °C.

Таблица 3

Подавление опиоидами связывания ^{3}H-налоксона[1] в препаратах мембран мозга крысы (осадок P_2)

	Концентрация, М	Связанный ^{3}H-нелоксон, расп./мин
Буфер *трис*-HCl[2]		
Без добавок	—	1297±68
+Норморфин	10^{-6}	1034±32
+β-Эндорфин	10^{-6}	1010±25
Сыворотка без экстрагируемой опиоидной активности		
Без добавок	—	1121±97
+Норморфин	10^{-5}	800±60
»	10^{-6}	778±114
»	10^{-7}	972±225
+β-Эндорфин	10^{-5}	773±51
»	10^{-6}	814±30
»	10^{-7}	861±125
+Tyr-(D)Ala-Gly-Phe-(D)Leu	10^{-6}	853±153
Сыворотка с экстрагируемой опиоидной активностью[3]		
Без добавок	—	1131±160
+Норморфин	10^{-6}	790±109

[1] Мембраны мозга крыс (осадок P_2) получали по методу Виттакера и Баркера [9]. Осадок P_2 суспендировали в *трис*-HCl-буфере (0,05 М, pH 7,4) до получения 10%-ного гомогената. 0,5 мл гомогената инкубировали с 0,5 мл *трис*-буфера (содержащего 65 мМ NaCl), 0,5 мл сыворотки (не содержащей экстрагируемой опиоидной активности) и 0,5 мл сыворотки (содержащей опиоидную активность в количестве 2 мкМ эквивалентов норморфина) соответственно, в течение 5 мин (37°) в присутствии или в отсутствие экзогенных опиоидов. После добавления ^{3}H-налоксона (17,1 Ки/ммоль, конечная концентрация $5 \cdot 10^{-10}$ М) препараты дополнительно инкубировали 15 мин и затем центрифугировали (10 000 g, 5 мин). Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадки готовили для определения радиоактивности в жидкостном сцинтилляционном спектрометре. Данные представлены как средние значения 3—4 тройных определений±средняя ошибка.

[2] 65 мМ NaCl.

[3] $2 \cdot 10^{-6}$ эквивалентов норморфина.

воротка с высокой опиоидной активностью, будучи добавлена к препаратам мембран (осадок P_2), насытить опиатные рецепторы. В табл. 3 суммированы результаты исследований, в которых сыэксперименты, которые должны были бы показать, может ли сыворотки без экстрагируемой опиоидной активности или сыворотки с высокой опиоидной активностью добавлялись в систему определения связывания с опиатными рецепторами (осадок P_2, гомогенизированный в *трис*-буфере). Связывание ^{3}H-налоксона с осадком P_2 снижалось в присутствии норморфина (10^{-6} М) и β-эндорфина (10^{-6} М). При проведении экспериментов с сывороткой, не содержащей экстрагируемой опиоидной активности, связывание ^{3}H-налоксона снижалось в зависимости от дозы при добавлении норморфина, β-эндорфина и производного энкефалина (Tyr-(D)Ala-Gly-Phe-(D)Leu). Когда в таких же экспериментах использовали сыворотку с высоким содержанием материала, обладающего опиатоподобным действием (конечная концентрация 1 мкМ эквивалентов норморфина) в отсутствие каких-либо экзогенных опиоидов, связывание ^{3}H-налоксона соответствовало таковому в сыворотке, лишенной экстрагируемого эндогенного материала с опиатоподобной активностью. Более того, при добавлении норморфина (10^{-6} M) снижение связывания ^{3}H-налоксона было примерно таким же, как и в контроле. Поскольку в случае сыворотки с высокой опиатоподобной активностью и сыворотки, не обладающей такой активностью, ^{3}H-налоксон проявляет сходные свойства в связывании с P_2, мы заключали, что материал с опиатоподобной активностью существует в неактивной форме, например в комплексе с белками. Экстракция сыворотки приводит к освобождению, а следовательно, и к активации этого материала, который затем связывается с опиатными рецепторами [8]. Существование этого материала в крови в неактивной форме представляется правдоподобным, поскольку такой механизм исключает возможность длительной занятости значительной части периферических или центральных опиатных рецепторов, к которым эти липофильные вещества могли бы легко проникать из крови.

В заключение можно сказать, что опиатоподобный материал в крови и моче обладает специфическими свойствами, отличающими его от известных опиоидных пептидов. Этот материал характеризуется: а) высокой липофильностью, б) резистентностью к проназе Р, в) медленным проявлением действия в подвздошной кишке морской свинки и vas deferens мыши, г) более высокой эффективностью действия в подвздошной кишке по сравнению с таковой в vas deferens и д) высокой резистентностью к кислотному гидролизу. Каждое из перечисленных аналитических данных не отвечает свойствам опиоидных пептидов. Мы пока не имеем данных о том, что описанные здесь опиатоподобные вещества мочи и крови представляют собой пептиды. Более того, эксперименты с факторами из крови и мочи показали, что антитела к энкефалинам или морфину не взаимодействуют ни с одним из этих веществ. Остается выяснить, не относятся ли исследуемые вещества к совершенно отличному классу субстратов, например к стероидам, которые также обладают опиатоподобной активностью.

⁂

Мы приносим благодарность д-ру Ло за предоставленный нам D-Ala-D-мет-энкефалин.

Список литературы

1. *Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H.* J. Biol. Chem., 226, 497—509 (1957).
2. *Kosterlitz H. W., Leslie F. M., Waterfield A. A.* Europ. J. Pharmacol., 32, 10—16 (1975).

3. *Kosterlitz H. W., Waterfield A. A.* Ann. Rev. Pharmacol., **15**, 29—47 (1975).
4. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 275—280, Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1976).
5. *Pert C. B., Pert A., Tallman J. F.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2226—2230 (1976).
6. *Schulz R., Goldstein A.* J. Pharmacol. exp. Ther., **183**, 404—410 (1972).
7. *Schulz R., Wüster M.* Europ. J. Pharmacol.. **43**, 383—384 (1977).
8. *Schulz R., Wüster M., Herz A.*, Life Sci., **21**, 105—116 (1977).
9. *Whittaker V. P., Barker L. A.* In: Methods in Neurochemistry, ed. R. Fried, pp. 1—52, Marcel Dekker, Inc., New York (1972).

РОЛЬ ЭНДОРФИНОВ В ЭНДОГЕННОМ ОБЕЗБОЛИВАНИИ

Л. ТЕРЕНИУС

(L. Terenius)

Нам представляется весьма возможным, что все млекопитающие обладают набором мощных и эндогенных центробежных механизмов регуляции поведения. Исследователям поведения, работающим над проблемой боли, предстоит решить в ближайшие годы важную задачу — разработать, а затем научиться контролировать условия и методы, с помощью которых люди могли бы при необходимости использовать с гарантией свои физиологические ресурсы [33].

В прошлом уже рассматривалась эндогенная модуляция боли. Это было постулировано в теории воротного контроля боли [42]. Косвенное подтверждение таких механизмов вытекает из ряда наблюдений. Анальгезия, или клиническое облегчение боли, может быть вызвана различными стимулами: акупунктурой [7, 56], «противоирритацией», вызываемой химическими веществами, экстремальными температурой или давлением [11] или электрической стимуляцией [29, 46]. Можно предположить, что все эти ответы обусловлены активацией эндогенных обезболивающих процессов.

Эндогенные морфиноподобные вещества, эндорфины [10, 13, 23, 58], возможно, являются одним из нейрогуморальных факторов в эндогенном обезболивании. В данном сообщении суммируется некоторая имеющаяся в нашем распоряжении информация о физиологическом или патологическом значении эндорфиновых механизмов в связи с болью. Главные эндорфины мозга, мет- и лей-энкефалин, различаются структурно только по C-концевой аминокислоте [24]. Распределение энкефалинов в мозгу изучалось биохимически [48, 54] и гистохимически [8, 25] с использованием меченных флуоресцеином антител к макромолекулам с энкефалинами в качестве гаптенов. Их распределение очень напоминает распределение опиатных рецепторов, определяемое биохимическими методами [21, 30]. Энкефалины распространены в участках, где морфин и родственные ему вещества вызывают поведенческую анальгезию: в заднем роге спинного нерва, в маргинальном слое, в substantia gelatinosa ядра спинального тракта тройничного нерва, в nucleus raphe magnus и в периакведуктальном центральном сером веществе. Тесная анатомическая кореляция между энкефалинсодержащими нервными терминалями и участками, богатыми опиатными рецепторами, дает основание предполагать, но не доказывает существование энкефалинэргических синапсов. Энкефалинэргические нейроны обладают, по-видимому, модуляторной функцией, как это предполагается для коротких энкефалинэргических (интер)нейронов в заднем роге спинного мозга. Представляется, что эти нейроны образуют аксон-аксонные синапсы с первичными афферентными волокнами (содержащими вещество P?), участвующими, очевидно, в опосредовании болевых стимулов [25, 32]. Помимо энкефалинов из мозга и гипофиза выделены некоторые другие эндорфины. Особый интерес вызывает β-эндорфин, пептид, состоящий из 31 аминокислоты, N-концевая последовательность которого идентична последовательности мет-энкефалина. Гипофизарная система сейчас охарактеризована, но остается еще неясным, участвуют ли выделяемые в кровь гипофизарные эндорфины в модуляции боли или других функций центральной нервной системы.

Методология

Изучение роли эндорфинов сильно упростилось благодаря наличию антагонистов опиатных рецепторов, таких, как налоксон и налтрексон. Было показано, что такие вещества полностью подавляют анальгезирующее действие опиоидных алкалоидов или экзогенно введенных опиоидных пептидов, а сами, очевидно, обладают пренебрежимо малой анальгезирующей активностью [38]. Эти антагонисты, следовательно, могут быть использованы в качестве ценного экспериментального инструмента. Однако, если действие антагонистов обнаруживается у животных, не знакомых с морфином, то нельзя исключить, что это отражает прямое действие антагониста. С другой стороны, отсутствие наблюдаемого эффекта еще не означает, что эндорфиновые механизмы не имеют существенного значения в изучаемом процессе, поскольку налоксон не обязательно должен быть эффективен во всех энкефалинэргических синапсах. Следует также отметить, что налоксон оказывается менее эффективным антагонистом в определенных системах, что, по-видимому, объясняется низким сродством наркотических антагонистов (так же как и опиоидных алкалоидов) к субпопуляции опиатных рецепторов, характеризующихся высоким сродством к опиоидным пептидам [35, 49, 57]. Изучение эндогенных механизмов обезболивания очень осложняется и сложной природой самой боли. Помимо соматического компонента боль характеризуется также и некоторыми психологическими аспектами, особенно важными у человека [33]. Определение тест-условий и ответной реакции оказывается в связи с этим чрезвычайно критическим.

Более прямой путь изучения эндорфиновой системы — это измерение действительного обмена эндорфинов. Однако в настоящее время необходимого для этого метода еще нет. Активность эндорфиновой системы может быть измерена определением содержания эндорфинов или их метаболитов в тканях или жидкостях тела. Особенно большое значение придается определению содержания эндорфинов в спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов; при этом были установлены некоторые клинические корреляции [34, 60], в связи с чем эти работы будут рассматриваться более подробно.

Эндорфины СМЖ выделяются с помощью относительно простого метода фракционирования, а их концентрация определяется с помощью радиорецепторного метода [59, 60]. Измеряемое содержание эндорфинов является, следовательно, функцией как сродства, так и концентрации лигандов рецепторов. Главные эндорфины при измерении радиорецепторным методом — это не энкефалины и не β-эндорфин. В связи с болью и анальгезией главный интерес представляет фракция СМЖ, обозначенная как фракция I. Схема ее получения и ее хроматографические свойства показаны на рис. 1. При оценке содержания фракции I наблюдаемая активность в радиорецепторном методе рассматривается так, как если бы она была обусловлена присутствием мет-энкефалина. Концентрация этой фракции, следовательно, выражается в пикомолях мет-энкефалина в миллилитре.

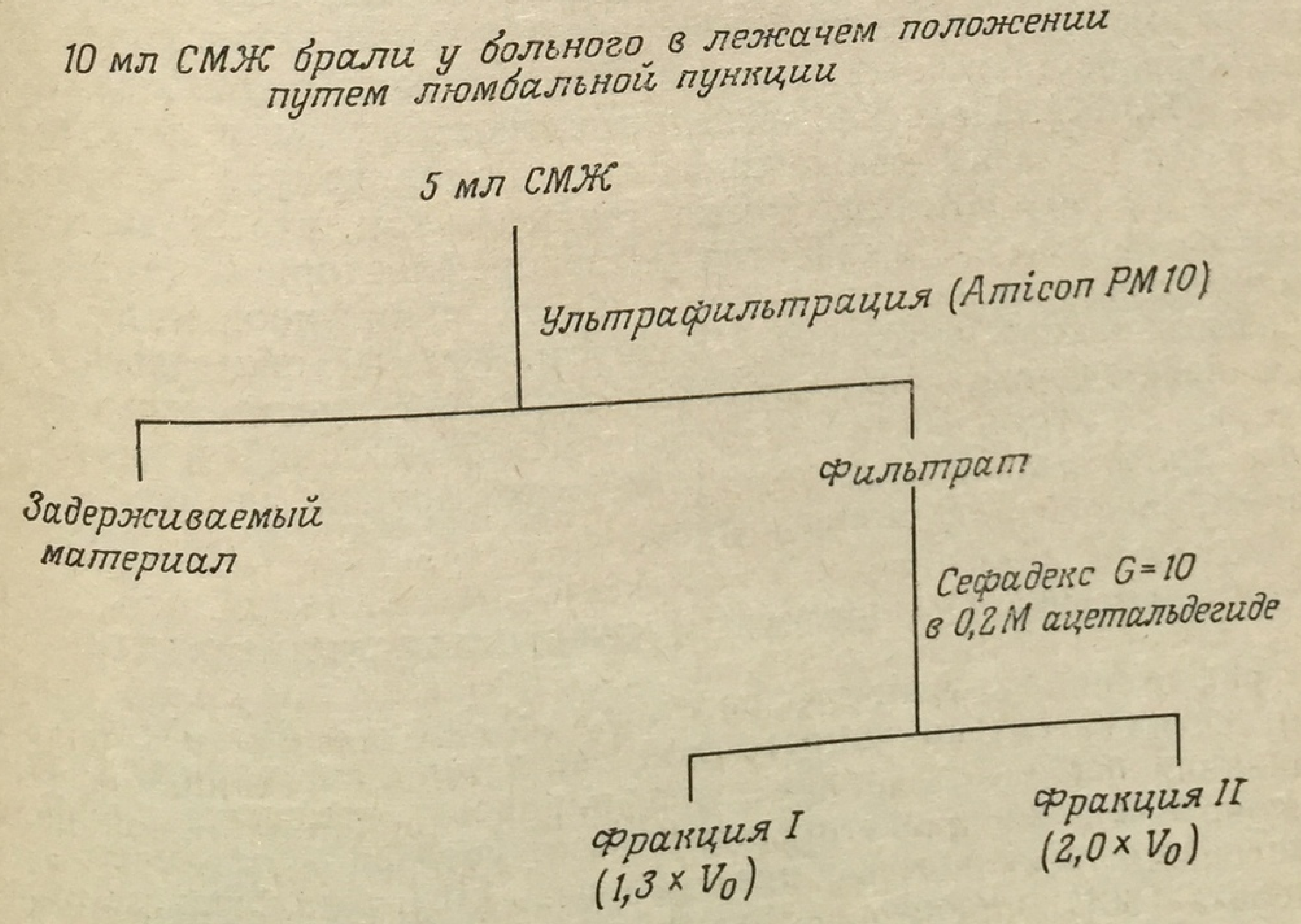

10 мл СМЖ брали у больного в лежачем положении путем люмбальной пункции
5 мл СМЖ
Ультрафильтрация (Amicon PM10)
Задерживаемый материал
Фильтрат
Сефадекс G=10 в 0,2 М ацетальдегиде
Фракция I (1,3 × V_0)
Фракция II (2,0 × V_0)

Рис. 1. Фракционирование спинномозговой жидкости (V_0 — свободный объем).

Результаты

Как указывалось выше, для изучения функционального значения эндофринов были использованы два подхода: эксперименты с наркотическими антагонистами, подобными налоксону, и измерение содержания эндорфинов в тканях и жидкостях тела. В ряде случаев использовалось сочетание обоих подходов.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ЖИВОТНЫХ

По данным некоторых авторов [27, 63], налоксон может вызывать гипералгезию у животных, не знакомых с морфином. Однако другие исследователи не обнаруживали такого эффекта [15]. А если такой эффект и наблюдается, то он очень мал и критически зависит от использованного метода. Интерпретация результатов упрощается в более простых системах, таких, как активность спинального рефлекса у кошек, в случае которого налоксон повышает активность, а морфин служит депрессантом [12]. Условная гипертермия у крыс также обращается налоксоном [31] — наблюдение которое можно объяснить условной стимуляцией высвобождения эндорфинов [35]. Однако наибольший интерес вызывает изучение анальгезии, индуцированной электрической стимуляцией. Будучи приложена к периакведуктальному серому веществу, такая стимуляция вызывает мощную анальгезию [39, 46]. Этот эффект, по данным одной группы [2], частично обращается налоксоном. Однако имеются также данные о том, что анальгезия может быть индуцирована такими процессами, которые не обращаются налоксоном [44, 64]. Периферическая электростимуляция акупунктурных точек у мышей также вызывает подавляемую налоксоном анальгезию [45]. Имеются также данные о том, что неизбегаемый шок конечностей или выработка условнорефлекторного страха увеличивают эндогенное образование общих эндорфинов мозга, определяемых радиорецепторным методом. Как и ожидалось, при этом наблюдается сопутствующее снижение чувствительности к болевым стимулам [6, 36]. Результаты исследований на животных более подробно обсуждаются в работах других авторов, статьи которых вошли в эту монографию.

НАБЛЮДЕНИЯ НА ЧЕЛОВЕКЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Инъекция больным-добровольцам налоксона не изменяет порога электрически индуцированной или ишемической боли [9, 16]. Однако у пациентов, получавших налоксон, отмечены слабые и тонкие изменения в настроении и самочувствии и ощущается повышенная озабоченность и враждебность [16]. Аналогичные исследования с налтрексоном — антагонистом более длительного действия — в основном подтвердили эти наблюдения [17], свидетельствующие в пользу крайне низкого высвобождения или эффективности эндорфинов в норме.

Способность к ощущению боли при нормальных физиологических условиях — свойство, необходимое для защитных реакций, и такое патологическое состояние, при котором боль не ощущается (врожденная анальгезия), представляет собой серьезное заболевание [62]. С другой стороны, может наблюдаться хроническая патологическая боль без какой-либо очевидной причины и тем не менее доставляющая больному тяжкие страдания. Причина хронической неустранимой боли часто кроется в органических поражениях периферических нервов. В этих случаях больной способен локализовать участок боли и точно описать свою болевую реакцию. У других больных локализация боли может быть менее определенной, больные могут быть подавлены, и кажется очевидным, что боль является проявлением психических нарушений, а не первичного соматосенсорного ощущения (опыта). Мы определяли содержание эндорфинов в образцах поясничной СМЖ, с тем чтобы попытаться проанализировать роль этиологических факторов в хронической боли. При использовании этого эмпирического подхода получены некоторые интригующие результаты. В основополагающих исследованиях было обнаружено, что случай тяжелой хронической боли органической природы (например, невралгия тройничного нерва) характеризуется сниженным содержанием эндорфинов во фракции I СМЖ (табл. 1, серия I). Более обширная группа больных с органической болью, невралгией тройничного нерва и послеоперационной болью (табл. 1, серия III), также характеризуется пониженным содержанием эндорфинов во фракции I по сравнению со здоровыми пациентами (серия II; $p < 0{,}01$).

Таблица 1

Содержание эндорфинов во фракции I спинномозговой жидкости пациентов с хроническими болями

№ серии	Категория пациентов	Содержание эндорфинов во фракции I[1], пмоль/мл СМЖ			Литература
		<0,6	0,6—1,2	>1,2	
I	Невралгия тройничного нерва	7	1		[59]
	Невралгические случаи без боли		4		
II	Здоровые добровольцы	3	12	4	[34]
III	Хронические боли (органические)	8	1		[52]
IV	Хронические боли (органические)	12	3	5	[3]
	Хронические боли (психогенные)	1	8	8	

[1] Выражено в единицах мет-энкефалина.

В серии IV была сделана попытка выяснить, связаны ли характер, локализация и природа боли с эндорфинами в СМЖ. Интересно, что психогенные боли, как установлено выше, сопровождаются нормальным или слегка повышенным значением содержания эдорфинов во фракции I. Различия между двумя группами в серии IV оказываются достоверными ($p<0{,}05$). Как подчеркивалось выше, боль представляет собой приобретенный психосоматический опыт, и следовательно, примечательно, что существует положительная корреляция между содержанием фракции I эндорфинов в СМЖ и степенью депрессии, оцениваемой по шкале CPRS ($p<0{,}01$). Эти наблюдения следует сравнить с результатами измерения содержания эндорфинов в СМЖ при депрессивных психозах, когда содержание эндорфинов во фракции I обычно велико. Так, в 8 из 11 случаев эндогенной депрессии и во всех 4 случаях маниакально-депрессивного психоза содержание эндорфинов фракции I в СМЖ превышало 1,2 пмоль/мл [34, 61].

Полученные результаты могут быть, по-видимому, суммированы следующим образом. У больных с хроническими органическими болями содержание эндорфинов фракции I низко, часто ниже уровня, характерного для здоровых людей. В случае диффузных психогенных болей, когда боль должна рассматриваться скорее как симптом, содержание эндорфинов фракции I может быть нормальным или выше нормального. С повышением депрессивного компонента содержание эндорфинов в СМЖ увеличивается и мо-

Таблица 2

Содержание эндорфинов во фракции I спинномозговой жидкости поясничного отдела у пациентов, испытывающих боль (контроль) и после внутримозговой электростимуляции (стимулированные)

Пациент	Причина боли	Степень облегчения боли	Обращение налоксоном	Содержание эндорфинов во фракции I, пмоль/мл СМЖ[1]	
				контроль[2]	стимулированные[3]
1	Рак молочной железы, метастазы в кости	Полное	[4]	2,3	7,6
2	Рак тела матки	Полное	Да	3,1	8,4
3	Боль в прямой кишке	Полное	Нет	0,4, 0,5, <0,4	0,5
4	Рак молочной железы	Неопределенное	[4]	<0,4	0,7
5	Рак мочевого пузыря, метастазы в кости	Нет	Нет	<0,4, <0,4	0,7, 0,8
6	Рак мочевого пузыря	Нет	[4]	<0,4	<0,4

[1] Выражено в эквивалентах мет-энкефалина.

[2] Препараты получены после 24 ч без стимуляции.

[3] Препараты после 24 ч стимуляции с 2—4-часовыми интервалами через 2—3 ч после начала последнего периода стимуляции.

[4] Не определяли.

жет достигать очень высоких значений (10—20 пмоль/мл) в случае эндогенных депрессий, когда боль может быть (хотя и не обязательно) выраженным симптомом.

Как упоминалось выше, внутримозговая стимуляция животных вызывает заметную анальгезию. Аналогичное воздействие на больных с неустранимой устойчивой болью приводило к полному или частичному облегчению боли [5, 19, 47]. В противовес данным, полученным при исследованиях на человеке, облегчение боли у животных не сопровождалось заметным повышением болевого порога [22]. Было отмечено, что такое вызванное стимуляцией облегчение боли обращалось налоксоном [1, 22]. В аналогичных, продолжающихся в настоящее время работах были скомбинированы анализ действия налоксона и определение эндорфинов в СМЖ. В табл. 2 представлено три случая полного снятия болей после внутримозговой электростимуляции и в двух из этих случаев отмечено увеличение содержания эндорфинов в СМЖ. В третьем случае снятие болей не обращалось налоксоном и не сопровождалось увеличением содержания эндорфинов в СМЖ. Три остальных случая не поддавались клиническому лечению, и содержание эндорфинов СМЖ не увеличивалось при стимуляции [43].

В другой серии больных с устойчивыми тяжелыми болями была применена периферическая электроакупунктура. У большей части пациентов наблюдалось клиническое облегчение (табл. 3). Образцы СМЖ отбирали спустя 15—30 мин после стимуляции. Увеличение содержания эндорфинов отмечено у таких больных, у

Таблица 3

Содержание эндорфинов во фракции I спинномозговой жидкости поясничного отдела у пациентов, испытывающих боль (контроль) и после электроакупунктуры (стимулированные)

Пациент	Причина боли	Степень облегчения боли	Содержание эндорфинов во фракции I, пмоль/мл СМЖ 1)	
			контроль 2)	стимулированные 3)
1	Посттравматическая невралгия, бедро	Полное	<0,4	0,8
2	Мононеврит, n. saphenous	»	0,5	1,3
3	Ущемление диска L4=L5	Частичное	0,9	2,0
4	Боль L5	Полное	<0,4	2,6
5	Herpes zoster	»	<0,4	<0,4
6	Невралгия тройничного нерва	Частичное	<0,4	<0,4
7	Невралгия тройничного нерва	Нет	<0,4	<0,4
8	Невралгия тройничного нерва	Полное	<0,4	0,5
9	Невралгия тройничного нерва	»	0,5	0,6

1) Выражено в эквивалентах мет-энкефалина.

2) Препараты получены через 24 ч без электростимуляции.

3) Препараты получены через 15—30 мин после начала стимуляции, когда пациент сообщил об облегчении боли.

которых стимуляция затрагивала поясничные сегменты — когда стимулятор применялся дистально по отношению к участкам боли. Благоприятным было вовлечение поясничных сегментов [52]. Этот тип облегчения болей в большинстве случаев обращался налоксоном [50].

Обсуждение

Мартин [38] высказал предположение, что «опиоиды, возможно, имитируют естественные процессы поведения»; если это так, то можно принять, что «анатагонисты с низкой собственной активностью должны противодействовать не только индуцированной морфином активности, но и естественной поведенческой активности, которая сходна по природе с эффектами морфина; в результате такие антагонисты должны вызывать антиморфиновый эффект». В связи с отсутствием наблюдаемых антиморфиновых эффектов Мартин и другие исследователи игнорировали такую возможность в отношении большинства опиаточувствительных систем. Полное или почти полное отсутствие эффектов при введении наркотических антагонистов незнакомым с морфином животным наблюдалось многократно. В связи с этим возникает вопрос: обладают ли эндогенные эндорфины меньшей эффективностью, чем опиоидные алкалоиды? Или же следует искать другое объяснение?

Общепризнано, что реакции на острую экспериментальную боль очень слабо затрагиваются налоксоном [9, 15, 16, 27, 63]. Это не является полной неожиданностью, поскольку морфин оказывает относительно слабое действие на болевой порог, но сильно влияет на реакции на болевые стимулы, т. е. вызывает толерантность к боли [28]. Толерантность к боли очень трудно экспериментально измерить, особенно у человека, когда на результат влияет множество факторов среды. Следует также различать острую боль как ответ на (экспериментальные) повреждающие стимулы, патологическую острую боль и условия неустранимой хронической боли. В последнем случае полагают, что боль возникает в результате соматического повреждения в болепроводящем тракте. Такое повреждение может приводить к нарушению баланса в механизмах «боль против анальгезии», когда боль плохо модулируется. Во всех случаях очень важную роль играет психологический компонент боли [33, 40]. Морфин и родственные ему вещества представляют собой психофармакологические агенты с присущими им [28] особенностями многообразного воздействия на настроение и самочувствие. Изучение эндогенных процессов, аналогичных тем, которые вызываются морфином, должно быть направлено по возможности на более общие и тонко изменяющиеся параметры, чем пороги острой боли.

Классическим подходом к изучению физиологического процесса является исследование патологических условий, когда могут быть предсказаны нарушения этого процесса. Результаты определения эндорфинов у больных с сильными хроническими болями органического происхождения (табл. 1 и текст) показывают, что система эндорфинов обладает слабой активностью в этих условиях. С другой стороны на депрессивных стадиях активность этой системы оказывается выше нормы. Главная ценность этих наблюдений заключается в том, что отклонения от нормы возникают при патологических ситуациях. Установить причинную взаимосвязь может оказаться труднее. Низкое содержание эндорфинов при хронических болях можно объяснить по крайней мере двумя причинами. Первая состоит в том, что боль сама по себе обусловливает общее снижение активности эндорфинов. Если это так, то мы вправе ожидать у больных общую гиперчувствительность к повреждающим стимулам; такая ситуация в самом деле была описана [40]. Этот механизм может защищать индивидуум от развития опиоидной толерантности и зависимости. Вторая возможная причина заключается в том, что локальная боль обусловлена местной недостаточностью в эндорфиновой системе; эта возможность кажется менее вероятной, поскольку трудно ожидать, чтобы это проявлялось в виде снижения общей активности эндорфинов.

Хорошо известно, что клинически значимое облегчение боли может быть индуцировано электростимуляцией, но лежащие в основе этого механизмы до настоящего времени не исследованы. Эксперименты на животных говорят в пользу гипотезы о том, что и при внутримозговой, и при периферической стимуляции важное значение имеет активация систем модуляции боли на спинальном и спинальном тройничном уровнях [4, 25]. В связи с этим интересно отметить, что в обоих случаях стимуляции увеличивается содержание эндорфинов в люмбальной СМЖ (табл. 2 и 3). Далее, факт обращения эффектов налоксоном свидетельствует в пользу гипотезы об участии механизмов активации эндорфинов. Столь же важно отметить, что облегчение боли, индуцированное другими типами электрической стимуляции, например условной высокочастотной стимуляцией [41, 53], обращается налоксоном [51]. Аналогичные данные получены в отношении анальгезии, индуцированной гипнозом [14]. По-видимому, могут существовать другие механизмы модуляции боли, отличные от эндорфинового механизма. Так, например, во многих работах указывается на анальгезирующее действие вещества Р [37, 55] и соматостатина [20] — пептидов, широко распространенных в центральной нервной системе [26]. Это опять возвращает нас к вопросу о физиологическом значении эндорфинов в регуляции боли. Если существует несколько параллельных модуляторных систем, то модуляция боли должна быть функцией совместного действия всего набора модуляторов. Блокирование одной из систем, такой, как эндорфиновая, может не давать легко наблюдаемого эффекта вследствие компенсаторного действия других систем. Определение точной роли эндорфинов в различных ситуациях потребует, видимо, весьма изощренных методов.

* *
*

Работа представляет собой результат плодотворного сотрудничества с несколькими клиниками Швеции.

Список литературы

1. *Adams J. E.* Pain, **2**, 161—166 (1976).
2. *Akil H., Mayer D. J., Liebeskind J. C.* Science, **191**, 961—962 (1976).
3. *Almay B. G. L., Johanson F., von Knorring L., Terenius L.* In preparation.
4. *Basbaum A. I., Clanton C. H., Fields H. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 4685—4688 (1976).
5. *Boethius J., Lindblom U., Meyerson B. A., Widén L.* In: Sensory Function of the Skin in Primates, ed. Y. Zotterman, pp. 531—548, Pergamon Press, Oxford (1976).
6. *Chance W. T., White A. C., Krynock G. M., Rosecrans J. A.* Eur. J. Pharmacol., **44**, 283—284 (1977).
7. *Chiang C.-Y., Chang C.-T., Chu H. L., Yang L.-F.* Sci. Sin., **16**, 210—217 (1973).
8. *Elde R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L.* Neuroscience, **1**, 349—351 (1976).
9. *El-Sobky A., Dostrovsky J. O., Wall P. D.* Nature, **261**, 783—784 (1976).
10. *Frederickson R. C. A.* Life Sci. (1977). In press.
11. *Gammon G. D., Starr I.* J. Clin. Invest., **20**, 13—20 (1941).
12. *Goldfarb J., Hu J. W.* Neuropharmacology, **15**, 785—792 (1976).
13. *Goldstein A.* Science, **193**, 1081—1086 (1976).
14. *Goldstein A., Hilgard E. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 2041—2043 (1975).
15. *Goldstein A., Pryor G. T., Otis L. S., Larsen F.* Life Sci., **18**, 599—604 (1976).
16. *Grevert P., Goldstein A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1291—1294 (1977).
17. *Charuvastra V. C.* Clin. Pharmacol. Ther., **19**, 773—776 (1976).
18. *Guillemin R.* Engl. J. Med., **1**, 226—227 (1977).
19. *Gybels J., Cosyns P.* In: Sensory Functions of the Skin in Primates, ed. Y. Zotterman, pp. 521—530, Pergamon Press, Oxford (1976).
20. *Havlicek V., Rezek M., Leybin L., Friesen H.* Fed. Proc., **36**, 363 (1977).
21. *Hiller J. M., Pearson J., Simon E. J.* Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **6**, 1052—1062 (1973).
22. *Hosobuchi Y., Adams J. E., Linchitz R.* Science, **197**, 183—186 (1977).
23. *Hughes J., Kosterlitz H. W.* Br. Med. Bull., **33**, 157—161 (1977).
24. *Hughes J., Smith T., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B., Morris H. R.* Nature, **258**, 577—579 (1975).
25. *Hökfelt T., Ljundahl A., Elde R., Nilsson G., Terenius L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3081—3085 (1977).
26. *Hökfelt T., Elde R., Fuxe K., Johansson O., Ljungdahl A., Goldstein M., Luft R., Efendic S., Nilsson G., Terenius L., Ganten D., Jeffcoate S. L., Rehfeld J., Said S., Perez de la Mora M., Possani L., Tapia R., Teran L., Palacios R.* In: The Hypothalamus, eds. S. Reichlin and R. Baldessarini, Raven Press, New York (1977). In press.
27. *Jacob J. J., Tremblay E. C., Colombel M.-C.* Psychopharmacology, **37**, 217—223 (1974).
28. *Jaffé J. H.* In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, eds. L. S. Goodman and A. Gilman, pp. 284—324, Macmillan, London (1975).
29. *Kane K., Taub A.* Pain, **1**, 125—138 (1975).
30. *Kuhar M. J., Pert C. B., Snyder S. H.* Nature, **245**, 447—450 (1973).

31. *Lal H., Miksic S., Smith N.* Life Sci., 18, 971—976 (1976).
32. *Lamotte C., Pert C. B., Snyder S. H.* Brain Res., **112**, 407—412 (1976).
33. *Liebeskind J. C., Paul L. A.* Ann. Rev. Psychol., 28, 41—60 (1977).
34. *Lindström L., Widerlöf E., Gunne L.-M., Wahlström A., Terenius L.* Acta Psychiatr. Scand. (1977). In press.
35. *Lord J. A. H., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* Nature, **267**, 495—499 (1977).
36. *Madden J.*, IV, *Akil H., Patrick R. L., Barchas J. D.* Nature, **265**, 358—360 (1977).
37. *Malick J. B., Goldstein J. M.* Fed. Proc., **36**, 994 (1977).
38. *Martin W. R.* Pharmacol. Rev., **19**, 463—521 (1967).
39. *Mayer D. J., Price D. D.* Pain, **2**, 379—404 (1976).
40. *Melzack R.* The puzzle of pain, Basic Books, New York (1973).
41. *Melzack R.* Pain, **1**, 357—373 (1975).
42. *Melzack R., Wall P. D.* Science, **150**, 971—973 (1965).
43. *Meyersson B. A., Terenius L., Wahlström A.* (1977). In preparation.
44. *Pert A., Walter M.* Life Sci., **19**, 1023—1032 (1976).
45. *Pomeranz B., Chiu D.* Life Sci., **19**, 1757—1762 (1976).
46. *Reynolds D. V.* Science, **164**, 444—445 (1969).
47. *Richardson D. E., Akil H.* J. Neurosurg. (1976). In press.
48. *Simantov R., Kuhar M. J., Pasternak G. W.. Snyder S. H.* Brain Res., **106**, 189—197 (1976).
49. *Simantov R., Snyder S. H.* Mol. Pharmacol., **12**, 987—998 (1976).
50. *Sjölund B., Eriksson M.* Lancet, **2**, 1085 (1976).
51. *Sjölund B., Eriksson M.* (1977). Personal communication.
52. *Sjölund B., Terenius L., Eriksson M.* Acta Physiol. Scand., **100**, 382—384 (1977).
53. *Shealy C. N. Maurer D.* Surg. Neurol., **2**, 45—47 (1974).
54. *Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P.* In: Opiates and Endogenous Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 57—62, North-Holland, Amsterdam (1977).
55. *Stewart J. M., Getto C. J., Neldner K., Reeve E. B., Krivoy W. A., Zimmermann E.* Nature, **262**, 784—785 (1976).
56. *Stewart D., Thomson J.. Oswald I.* Br. Med. J., **1**, 67—70 (1977).
57. *Terenius L.* Psychoneuroendocrinology, **2**, 53—58 (1977).
58. *Terenius L.* Ann. Rev. Pharmacol. (1978). In press.
59. *Terenius L., Wahlström A.* Life Sci., **16**, 1759—1764 (1975).
60. *Terenius L., Wahlström A., Lindström L., Widerlöf E.* Neuroscience Letters, **3**, 157—162 (1976).
61. *Terenius L., Wahlström A., Agren H.* Psychopharmacology (1977). In press.
62. *Thrush D. C.* Brain, **96**, 369—386 (1973).
63. *Walker J. M., Berntson G. G., Sandman C. A., Coy D. H., Schally A. V., Kastin A. J.*, Science, **196**, 85—87 (1977).
64. *Yaksh T. L., Yeung J. C., Rudy T. A.* Life Sci., **18**, 1193—1198 (1976).

УКАЗЫВАЮТ ЛИ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭНДОРФИНОВ НА ИХ УЧАСТИЕ В ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ?

А. ГЕРЦ, Дж. БЛЁЗИГ, Г. ЭМРИХ, К. КОРДИНГ,
С. ПИРИ, А. КЁЛЛИНГ, Д. ЦЕРСЕН

(A. Herz, J. Bläsig, H. M. Emrich, C. Cording,
S. Pirée, A. Kölling, D. V. Zerssen)

В настоящее время имеется мало данных о физиологической роли опиатоподобных эндогенных пептидов (эндорфинов). Введение специфического опиатного антагониста, такого, как налоксон, людям и животным, не получавшим предварительно опиатов, не приводит ни к каким резко выраженным последствиям; только при особых экспериментальных условиях могут быть выявлены некоторые эффекты [6, 8]. Эти эффекты указывают на участие эндорфинов в регуляции боли и стресса. При введении эндорфинов в изолированные органы или интактным животным наблюдаемые эффекты в целом соответствуют эффектам, индуцированным опиатами. Естественно, что при введении пептидов следует рассматривать их собственную кинетику. Недавно в результате более детальных исследований получены данные о существенных различиях не только между фармакологическими эффектами эндорфинов и опиатов, но и между эффектами различных представителей внутри обоих классов соединений. Более того, результаты некоторых исследований показывают, что эндорфины в отличие от морфина могут индуцировать кататонический синдром. Следовательно, можно предположить, что эндорфины играют определенную роль в симптоматологии кататонического состояния у больных шизофренией [2, 9, 10]. В качестве возможного объяснения таких различий в эффектах, индуцированных различными опиоидами, высказывалось предположение о существовании разных типов опиатных рецепторов, обладающих различным сродством к опиоидам [5, 13, 15]. С целью дальнейшего исследования этой гипотезы было проведено сравнение определенных поведенческих особенностей, индуцированых тремя типичными опиатными агонистами и некоторыми опиоидными пептидами. В то же время для изучения роли эндорфинов в шизофрении исследовали влияние налоксона на психотическую симптоматологию.

Эксперименты на крысах

МЕТОДЫ

Были использованы крысы-самцы Спрэг-Доули весом около 200 г. Анальгезию измеряли с помощью слегка модифицированного «голосового теста» [16], при котором голосовой сигнал индуцировали электростимуляцией основания хвоста с помощью биполярного электрода. Различные степени кататонического состояния (определяемого другими авторами как «ригидность», «неподвижность» или «каталепсия») оценивали в соответствии со следующими критериями. Оценка 1 давалась в тех случаях, когда положение крыс, помещенных передними лапками на горизонтальную полочку высотой 15 см на 30 с, изменялось под влиянием тактильного (дотрагивание) или звукового стимула. Если же положение не изменялось, давали оценку 2. Оценка 3 давалась в тех случаях, когда у крыс утрачивался рефлекс вставания в сочетании с чрезвычайной мышечной ригидностью и ступором. Наличие мышечной ригидности оценивали путем изгиба задней конечности. Ректальную температуру измеряли с помощью термистора.

Для внутрижелудочковых инъекций в правый латеральный желудочек мозга имплантировали канюли примерно за неделю до начала эксперимента. Объем инъецируемой жидкости, вводимой с помощью микрошприца, составлял 10 мкл. На каждом животном проводился только один эксперимент.

Использованные препараты:
β-эндорфин (предоставлен доктором Ли, Сан Франциско, или получен из Peninsula Iab., San Caros, Calufornia);
D-Ala^2-мет-энкефалинамид (Peninsula Lab., San Carlos, California);
D-Ala^2-D-лей-энкефалин (доктор Уилкинсон, Welcome Lab., Buckenham, England);
суфентанил (Janssen, Beerse, Belgium);
эторфин (Reckitt and Sons, Kingston-upon-Hill, England);
морфингидрохлорид (Merck, Darmstadt, Germany);
метадонгидрохлорид (Hoechst, Frankfurt/M., Germ.);
налоксонгидрохлорид (Endo Laboratories, Garden City, New York, USA).

В случае солей их концентрации рассчитывались по основаниям.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутрижелудочковые инъекции трех пептидов приводят во всех случаях к сходному, зависимому от дозы, выраженному увеличению анальгезии и кататонии; β-эндорфин был примерно в 10 раз более эффективен (в молярных соотношениях), чем D-Ala^2-D-лей-энкефалин и D-Ala^2-мет-энкефалинамид. Сравнение эффективности пептидов в повышении болевого порога, с одной стороны, и в индукции кататонии, с другой стороны, показало, что увеличение порога стимуляции примерно до 1000 мкА (примерно 3-кратное увеличение над базальным уровнем) сопровождается кататонией с оценкой 1, тогда как увеличение болевого порога до приблизительно 1500 мкА соответствует кататонии с оценкой 2. Эта взаимосвязь между степенью анальгезии и кататонии оказывается одинаковой для всех трех пептидов (рис. 1). На этом рисунке показаны дозы испытываемых веществ, при которых обнаруживаются оба эффекта (приведенные на этом рисунке дозы интерполированы по кривым доза — эффект).

При внутрижелудочковом введении морфина зависимость доза — ответ для анальгезии также описывается крутой кривой, причем эффективность морфина была весьма близка к эффективности обоих пентапептидов. Кататония, однако, никогда не достигала оценки 2 даже при самых высоких дозах морфина (100 мкг) (рис. 1). Кататония достигала постоянного уровня, соответствующего примерно оценке 1,5 при дозах морфина, превышающих 25 мкг. Это согласуется с результатами других исследований [1, 2]. Однако при использовании эторфина и суфентанила — опиатов с очень высоким сродством к рецепторам — крутые кривые доза — ответ получены не только для анальгезии, но и для кататонии, которая в этих случаях достигает оценки 3. Судя по данным, представленным на рис. 1, количественная взаимосвязь анальгезия/кататония у этих двух опиатов весьма близка к той, которая обнаруживается в случае опиатоподобных пептидов. Из этого следует, что высокая эффективность пептидов в индукции кататонии не является каким-то особенным свойством этих соединений, но характерна для опиатов с высоким сродством к рецепторам. Аналогичные различия в степени индуцированной кататонии были недавно отмечены [16] для норморфина, с одной стороны, и β-эндорфиноподобных гипофизарных пептидов или эторфинов — с другой.

Причина, по которой в случае морфина не достигается высокая степень кататонии, пока еще не выяснена, но, возможно, это объясняется низким сродством морфина к рецепторам. Это низкое сродство требует применения высоких доз морфина, в результате чего возникают неспецифические (возбуждающие) эффекты, которые могут противодействовать кататонии. Такие неспецифические возбуждающие эффекты морфина наблюдаются также после его местных микроинъекций [11].

Измерение ректальной температуры в этих экспериментах показало, что между кататонией и гипотермией существует тесная корреляция. При внутрижелудочковой инъекции β-эндорфина или суфентанила наблюдается снижение температуры тела на 1—2 °С (в верхней части кривых доза — ответ на рис. 1). Характер развития кататонии и гипотермии во времени оказывается весьма сходным. После обращения кататонического состояния и появле-

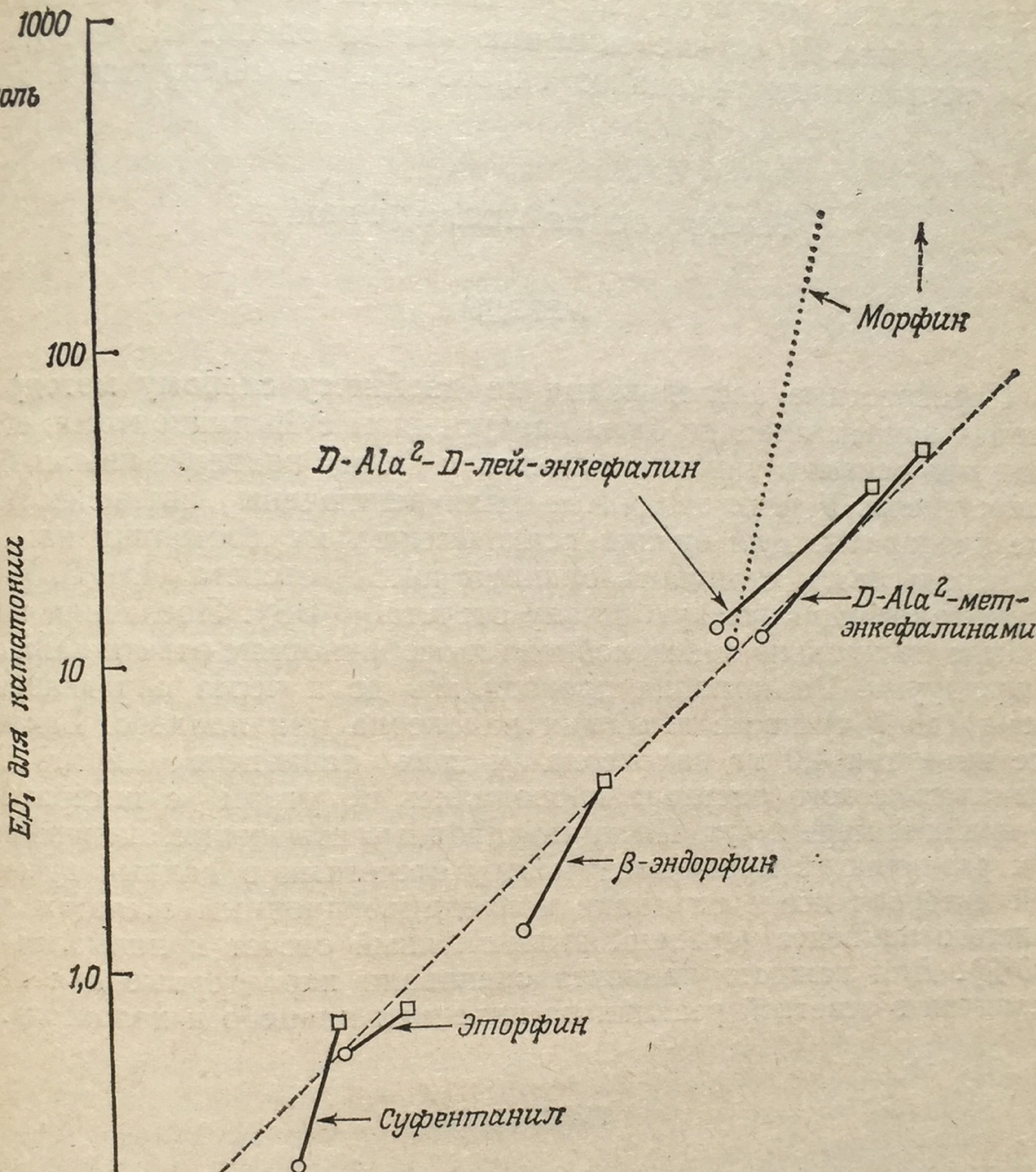


Рис. 1. Дозы, при которых достигается увеличение болевого порога до 1000 мкА (○) или 1500 мкА (□), коррелируют с дозами, при которых достигается кататония степени 1 (○) или 2 (□). Значения доз получены из кривых доза — ответ. Стрелка (———→) указывает, что морфин вызывает повышение болевого порога до 1500 мкА при дозе 30 нмоль, тогда как кататония степени 2 при этой дозе не достигается. Прерывистая линия (— — — — — — —) указывает строго пропорциональное соотношение между анальгезией и кататонией.

ния реактивной моторной гиперактивности гипотермия переходит в гипертермию. В случае морфина (когда оценка 2 не достигалась) достоверных признаков гипотермии не обнаруживалось.

Клинические исследования

МЕТОДЫ

Перекрестные исследования по двойному слепому методу с использованием плацебо были предприняты с 20 пациентами, страдающими частыми галлюцинациями и (или) подверженными бредовым идеям. У всех пациентов были исключены антипсихотические препараты. Для оценки психопатического состояния пациентов использовали стандартизованную шкалу отсчета (IMPS, [14]) и симптомоспецифическую шкалу отсчета (VBS). Последняя шкала была специально приспособлена к особенностям ответа каждого индивидуума. Регистрация проводилась до и через определенное время (до 7 ч) после инъекции налоксона или плацебо. Единичные инъекции 4,0 мг налоксона (у трех пациентов 1,2 мг) или физиологического раствора проводились по утрам с интервалом по крайней мере 2 сут. Постинъекционные изменения оценивались как различия (в процентах) между отсчетами в данный временнóй интервал после инъекции и прединъекционным отсчетом для каждого пациента (средний инъекционный отсчет принимался за 100%). Для каждого пациента оценивали характерные для него различия в ответной реакции на инъекции плацебо и налоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У 13 из 20 исследованных нами больных были диагносцированы острые приступы шизофрении или шизоаффективного психоза. У остальных пациентов был поставлен диагноз «хроническая шизофрения», «алкогольные галлюцинации» или «инволюционный параноидный психоз». При обобщении результатов, полученных на всех больных, оказалось, что среднее снижение психотической симптоматологии наблюдалось как после введения налоксона, так и после введения плацебо. Однако по обеим шкалам отсчета эффект налоксона оказывался более выраженным, чем эффект плацебо. Эффект плацебо продолжался не более чем 60 мин после инъекции, тогда как действие налоксона сохранялось в течение нескольких часов после инъекции. Различия между эффектами налоксона и плацебо по шкале VBS оказались более выраженными, чем по шкале IMPS: максимальные различия между эффектами налоксона и плацебо по шкале IMSP наблюдались через 320 мин (p=0,036), по шкале VBS — через 360 мин (p=0,012); по-видимому, это связано с тем, что шкала VBS лучше приспособлена к оцениваемым симптомам пациентов (галлюцинации и/или бредовые идеи), чем шкала IMPS. Если превышение эффекта налоксона над плацебо на 5% рассматривать как указание на эффективность действия налоксона, то налоксон оказывается эффективным у 12 пациентов (7 острых и 3 хронических случая шизофрении, 1 пациент с алкогольными галлюцинациями и 1 пациент с инволюционным параноидным психозом).

Результаты настоящего исследования расходятся с негативными результатами Волавка и др. [17] и результатами Дэвиса и др. [3], отметивших улучшение только одного из прослеживаемых ими симптомов шизофрении («необычное глубокомыслие»). Эти авторы не наблюдали индуцированного налоксоном изменения в галлюцинациях. Немедленное кратковременное и обратимое прекращение галлюцинаций отмечено в опытах Гуна и др. [7] выполненных простым слепым методом. Некоторые из полученных расхождений, возможно, объясняются методологическими различиями, такими, как отбор пациентов (в нашем случае главным образом нелеченая острая шизофрения), более высокие дозы налоксона и более продолжительный период наблюдения после инъекции. Для более детального обсуждения результатов нашего клинического исследования следует обратиться к сообщению Эмриха и др. [4].

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные эксперименты не подтверждают представления о существовании фундаментальных различий в спектрах поведенческих признаков между эндогенными опиоидами и опиатами. Судя по нашим наблюдениям, идея о том, что индуцируемое у животных состояние, подобное кататонии, имеет ту же природу, что и кататонический синдром у больных шизофренией, представляется маловероятной. Руководствуясь этой идеей, невозможно объяснить, почему опиаты с высоким сродством к рецепторам также индуцируют такие кататонические состояния, но не обладают, по-видимому, психогенным действием. В отличие от чистых опиатных агонистов частичные опиатные агонисты, такие, как циклазоцин и налорфин, индуцируют дисфорические галлюцинации, причем их эффекты подавляются налоксоном [12]. На основании этого факта была высказана гипотеза об участии «патологических» опиоидных пептидов в патогенезе шизофрении, в связи с чем были предприняты первые попытки исследовать влияние налоксона на шизофренические галлюцинации [7]. Существует ряд указаний в пользу этой гипотезы, хотя на основании имеющихся в нашем распоряжении данных мы не можем сделать каких-либо заключений, подтверждающих ее правильность.

Список литературы

1. *Barnett A., Goldstein I., Fiedler E., Taber R.* Europ. J. Pharmacol., **30**, 23—28 (1975).
2. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
3. *Davis G. C., Bunney W. E., Jr., Fraites de E. G., Kleinman J. E., Kamen van D. P., Post R. N., Wyatt R. Y.* Science, **197**, 74—77 (1977).
4. *Emrich H. M., Cording C., Pirée S., Kölling A., v. Zerssen D., Herz A.* Pharmakopsychiatrie — Neuro-Phychopharmakologie (1977). In press.
5. *Gilbert P. E., Martin W. R.* J. Pharmacol. exp. Ther., **198**, 66—82 (1976).
6. *Grevert P., Goldstein A.* Psychopharmacology, **53**, 111—113 (1977).
7. *Gunne L. M., Lindström L., Terenius L.* J. Neural Transmission, **40**, 13—19 (1977).
8. *Jacob J. J., Tremblay E. C., Colombel M. C.* Psychopharmacologia (Berl.), 37, 217—223 (1974).
9. *Jacquet Y. F., Marks N.* Science, **194**, 632—634 (1976).
10. *Jacquet Y. F., Marks N., Li C. H.* In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, ed. H. W. Kosterlitz, pp. 411—414, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1976).
11. *Jacquet Y. F., Carol M., Russel I. S.* Science. **192**, 261—263 (1976).
12. *Jasinski D. R., Martin W. R., Haertzen C. A.* J. Pharmacol. exp. Ther., 157, 420—426 (1967).
13. *Lord J. A., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. M.* Nature, **267**, 495—499 (1977).
14. *Lorr M., Klett C. J., McNair D. M., Lasky J. J.* Consulting Psychologists Press Palo Alto/Calif. (1962).
15. *Martin W. W., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E.* J. Pharmacol. exp. Ther., **197**, 517—532 (1976).
16. *Teschemacher H., Bläsig J., Kromer W.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **294**, 293—295 (1976).
17. *Volavka J., Mallya A., Baig S., Perez-Cruet J.* Science, **196**, 1227—1228 (1977).

β-ЭНДОРФИН. СУБЪЕКТИВНЫЕ И ОБЪЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ОСТРОЙ НАРКОТИЧЕСКОЙ АБСТИНЕНЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

Д. КЭТЛИН, К. К. ХЬЮИ, Г. ЛО., Ч.-Х. Ли
(D. H. Catlin, K. K. Hui, H. M. Loh, C.-H. Li)

ВВЕДЕНИЕ

Ли и сотрудники выделили недавно из гипофиза верблюда и человека унтриаконтапептид с морфиноподобной активностью, который был охарактеризован и синтезирован [5—8]. Этот пептид, названный β-эндорфином, по своей аминокислотной последовательности идентичен последовательности из 31 аминокислоты на С-конце гипофизарного гормона β-липотропина [9]. В опубликованном недавно обзоре [11] приведены данные по фармакологии β-эндорфина. Этот пептид индуцирует изменения поведенческих реакций у кошек [13] и выраженное кататонического типа состояние у крыс [1]. Он является эффективным анальгезирующим средством; имеется довольно много сообщений о толерантности к β-эндорфину и физической зависимости от него [2, 3, 8, 10, 15, 16]. β-Эндорфин подавляет у мышей реакцию прыжка, наблюдаемую в тех случаях, когда им резко прекращают вводить морфин [15, 16]. Во всех вышеупомянутых работах β-эндорфин вводили в желудочек мозга, но, как недавно показали Тзенг и сотр. [14], β-эндорфин активен у мышей и при внутривенном введении. Ниже мы приводим данные о влиянии внутривенного введения β-эндорфина на наркотический синдром абстиненции у человека после резкого прекращения введения метадона. Мы вводили также β-эндорфин трем больным с хроническими болями и еще одному больному с острой наркотической абстиненцией; данные об этих четырех больных приведены в отдельном сообщении.

Материалы и методы

ПРЕПАРАТЫ

Все внутривенно вводимые препараты добавляли в содержащий 5%-ный раствор глюкозы (декстрозы) резервуар (volutrol) USP, поставляемый Trevenol Labs., Inc., Deerfield, Ill. β-Эндорфин человека был синтезирован, как описано ранее [6, 8]. Дозу в

30 мг (375 мкг/кг) вводили путем внутривенной инфузии в течение 30 мин. Морфинсульфат был получен от Eli Lilli and Co., Indianopolis, Indiana.

ПАЦИЕНТ

Пациент, 35-летний мужчина, начал принимать наркотики в возрасте 14 лет. Между 18 и 27 он постоянно принимал героин, за исключением кратковременного периода вынужденной абстиненции. После нескольких безуспешных попыток прекратить прием героина, он в возрасте 27 лет включился в программу поддержания метадоном и в течение последующих 7 лет получал метадон в дозе 40—80 мг ежедневно. В течение четырех недель, предшествующих тому дню, когда он включился в исследование и прекратил прием наркотика, его ежедневная доза наркотика постепенно снижалась с 80 до 50 мг.

ОБЩИЙ ПЛАН ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациента обследовали в специальной госпитальной палате (Клинический исследовательский центр UCLA), оборудованной и укомплектованной персоналом для проведения клинических исследований. В тех случаях, когда присутствия пациента не требовалось по протоколу, он мог свободно перемещаться по палате и при соответствующем разрешении покидать палату. Перед началом исследования была получена полная история болезни, проведено физическое обследование, пациенту объяснили суть проводимого исследования и получили его письменное согласие. Лабораторные исследования включали в себя анализ мочи, подсчет лейкоцитов и эритроцитов, определение содержание гемоглобина, показателя гематокрита, протромбинового времени, электролитов, креатинина, остаточного азота, D-аспартат — аминотрансферазы, D-аланин — аминотрансферазы и щелочной фосфатазы, рентгенограмму грудной клетки и электрокардиограмму (ЭКГ). Некоторые из этих тестов повторяли через 2—7 дней после завершения протокольного обследования. Всю мочу пациента собирали для последующего анализа.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Больного ежедневно взвешивали в 7 ч утра. Все другие определения производили после того, как больной пребывал в лежачем положении по крайней мере в течение 10 мин. Температуру в полости рта регистрировали через 4 мин после того, как ставили под язык термометр. Для всех измерений использовали один и тот же термометр, калиброванный для проверки его точности. Аналогично один и тот же сфигмоманометр применялся для всех определений давления крови.

В различное время в течение дня и в период инфузий телеметрически регистрировали ЭКГ и дыхание. Три кожных электрода размещались на грудной клетке спереди, и термистор, закрепленный вблизи ноздри, соединяли с телеметрической камерой размером 1×5×10 см. Сигнал от телеметрической камеры поступал в приемник с частотной модуляцией и одновременно регистрировался на магнитной ленте и визуализировался на ленточном самописце. Счетчик скорости регистрировал частоту пульса и дыхания в течение предшествующего 60-секундного интервала. Все данные обрабатывали вручную путем подсчета каждого QRS и дыхательного комплексов. Приводимые данные представляют собой средние значения, полученные при 20—30 последовательных измерениях, проводимых с интервалом в 1 мин.

Интенсивность синдрома абстиненции оценивали по методу Химмельсбаха [4], в котором пункты предназначены для обозначения слезотечения, ринореи, зевоты, расширения зрачков, тремора, суетливости, потения, вставания волос дыбом, рвоты, увеличения систолического давления крови, температуры и скорости дыхания. В качестве базальных значений для последних трех наблюдений использовали средние значения 5 измерений, проводимых с 3-часовым интервалом в течение первых 24 ч после последней дозы метадона. Количественную оценку интенсивности синдрома абстиненции получали, суммируя пункты [4], что давало величину подсчета интенсивности абстиненции (ПИА). Величину ПИА определяли с интервалом 0,5—1 ч в течение периода инфузии и с частыми интервалами в течение остальной части дня. Кроме того, пациентов часто просили рассказать о своем состоянии в плане их субъективного состояния в данный момент [12]. Была использована порядковая шкала самочувствия (ШС) со следующими градациями: очень хорошо, хорошо, средне, слегка плохо, плохо и очень плохо; этим градациям были даны оценки +2, +1, 0, —1, —2 и —3 соответственно.

ПРОТОКОЛ

Прием всех лекарственных препаратов прекращался в утро того дня, когда начиналось исследование. Диазепам в дозе 10—20 мг вводили в 23.00. В случае тяжелой абстиненции давалась доза морфинсульфата (7,5—10 мг) между 24.00 и 6.00. Внутривенную инфузию, продолжавшуюся 2—5 ч, начинали в день, когда значение ПИА достигало или превосходило 20 пунктов — значение, характеризующее абстиненцию средней тяжести [4]. Через 1 ч после начала инфузии предпринимались последовательные серии из 4—7 периодов по 30 мин каждый. В начале каждого периода в инфузионный резервуар добавляли либо исследуемый препарат, либо физиологический раствор. Оборудование для инфузии располагалось за занавеской, так что пациенту были неизвестны моменты времени, в которые проводилось введение препарата или физиологического раствора. Значения ПИА и ШС оценивались с интервалом в 0,5—1 ч. Наблюдатель, который был осведомлен о сути исследования, но не знал, в какой последовательности вводятся препараты, проводил с интервалом в 0,5—1 ч субъективную оценку их действия.

Результаты

Основные объективные измерения, проведенные в течение 8 дней исследования, приведены на рис. 1. Следует подчеркнуть несколько моментов: наиболее важно отметить, что оценки производились не в какие-то фиксированные моменты времени, а так, что интервалы между измерениями варьировали от 20 мин до 13 ч. 30-минутные интервалы соответствовали инфузиям на 6-й и 8-й дни. Вертикальная стрелка около названия препарата указывает на внутримышечное введение этого препарата, а короткая горизонтальная стрелка обозначает 30-минутный период, в течение которого проводилась инфузия исследуемого препарата. Длинные горизонтальные стрелки, соответствующие 5, 6 и 8-му дням, указывают на период инфузии глюкозы.

Отчетливо видно, что ожидаемое повышение значения ПИА, пульса, давления крови, температуры и скорости дыхания наблюдаются через 48 ч (3-й день в 11.00) после того, как прекращают вводить метадон. Морфинсульфат в дозе 10 мг вводили внутримышечно в 3.00 на 5-й день; непосредственно перед введением препарата никаких формальных измерений не проводили. Низкие значения ПИА и скорости дыхания спустя 3 ч (не показано) и 8 ч (в 11.00) служат показателем реакции организма на морфин. И наоборот, через 6 ч после внутримышечного введения морфинсульфата в дозе 7,5 мг в 3.00 на 7-й день действия на ПИА не обнаруживается и скорость дыхания остается высокой.

Инфузия глюкозы между 18.00 и 21.00 на 5-й день не связана с какими-либо изменениями в объективных признаках наркотической абстиненции. В ходе этой инфузии физиологический раствор добавляли в резервуар с интервалами в 30 мин. Примерно через 1 ч после добавления физиологического раствора пациент отметил улучшение состояния и указал, что чувствует себя почти нормально (ШС=0), тогда как часом ранее значение ШС у него было равно —2. Независимый наблюдатель отметил минимальное и кратковременное улучшение. На 6-й день инфузию проводили в течение шести 30-минутных периодов, обозначенных на рис. 2, А—Е. 30 мг β-эндорфина вводили с постоянной скоростью в течение второго периода (Б). Как показано на рис. 1, в ходе введения β-эндорфина значение ПИА и скорость дыхания снижались, причем эти изменения сохранялись в течение по крайней мере 6 ч

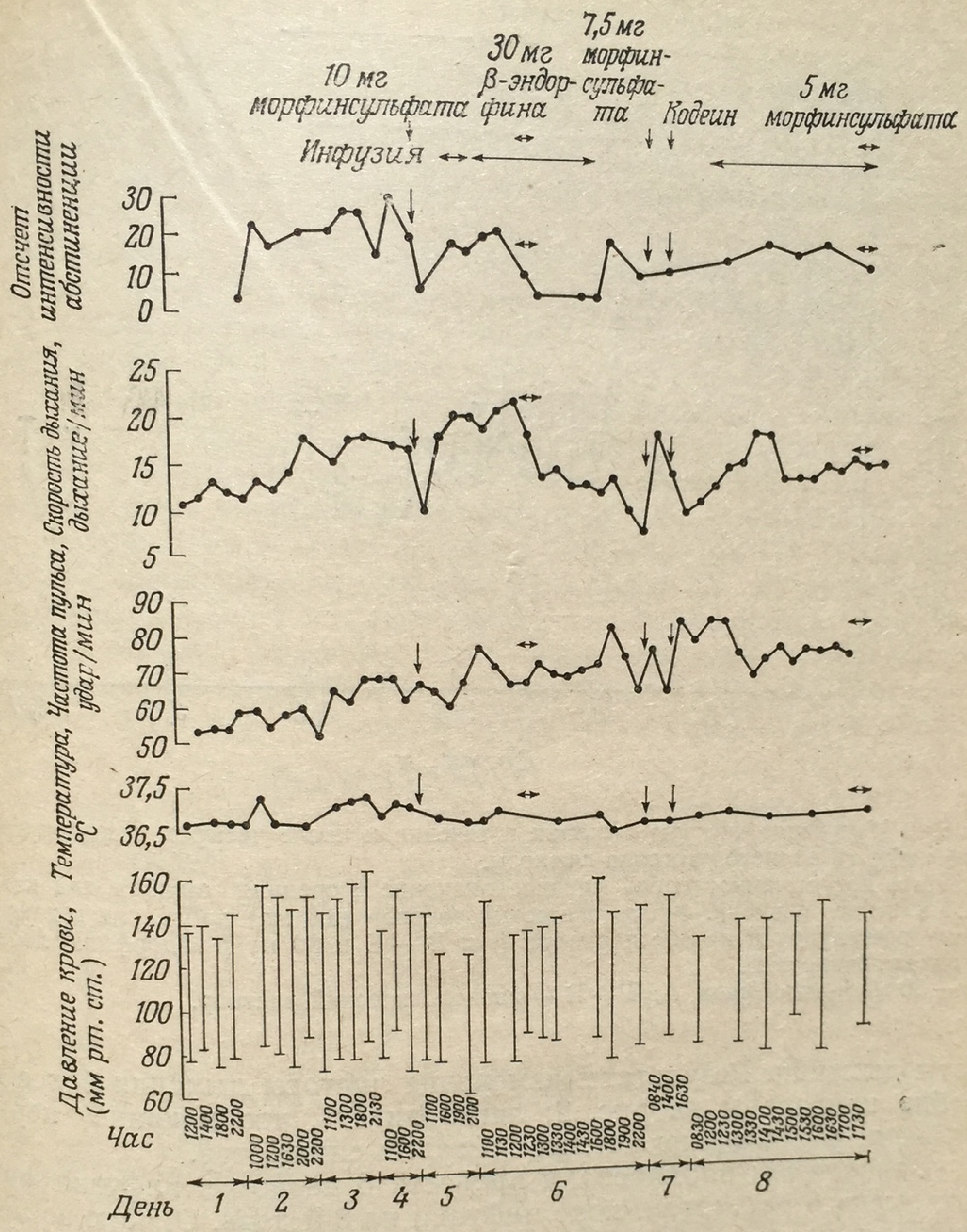


Рис. 1. Изменения физиологических показателей и отсчета интенсивности абстиненции (ПИА) в течение 8 дней после приема последней дозы метадона. Горизонтальные линии, соответствующие каждой шкале, приводят в соответствие полученные данные с днями и часами, в которые проводилось наблюдение, приведенными в нижней части рисунка. Вертикальные черточки соединяют систолическое и диастолическое давление крови. Горизонтальными и вертикальными стрелками показана инфузия глюкозы или введение лекарственных препаратов, как описано в тексте.

(до 18.00). Во время введения β-эндорфина и сразу после введения не было отмечено существенных изменений пульса, давления крови или температуры. Между шестью (18.00) и десятью (22.00) часами после введения β-эндорфина наблюдали снижение и пульса, и час-

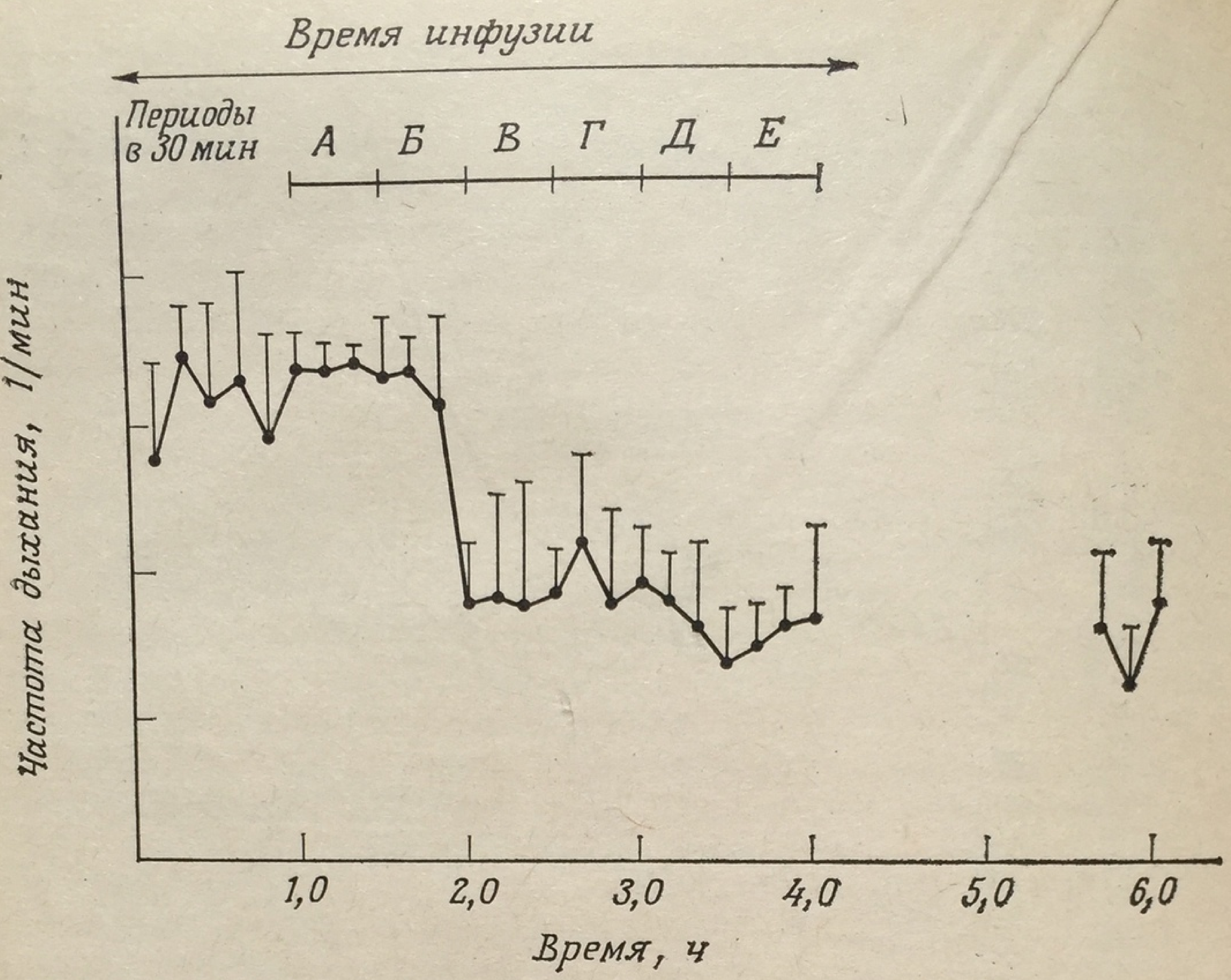


Рис. 2. Изменение частоты дыхания в течение и после четырех часов внутривенной инфузии водного раствора глюкозы.
Данные представляют собой среднее значение ± средняя ошибка для каждого 10-минутного периода. Физиологический раствор (3,0 мл) добавляли к инфузионному резервуару в начале периодов А и В — Е и 30 мг β-эндорфина добавили в начале периода Б.
Б — 30 мг β-эндорфина, А, В — Е — физиологический раствор.

тоты дыхания. Результаты измерения частоты дыхания более подробно приведены на рис. 2; легко видеть, что в конце периода инфузии β-эндорфина частота дыхания снижается.

Вначале мы планировали провести 6 периодов инфузии физиологического раствора в ходе инфузии на 8-й день. Однако во время инфузии исследуемый пациент заявил, что по семейным обстоятельствам он решил прекратить обследование. В связи с этим был назначен дополнительный период, в течение которого пациенту инфузировали 5 мг морфинсульфата (Ж на рис. 3). Мы надеялись получить при этом дополнительный положительный контроль, но пациент пробыл в клинике не настолько долго, насколько это было необходимо, чтобы оценить эффект. Низкие значения ПИА и частоты дыхания, наблюдаемые между 14.00 и 16.00 на 7-й день, объясняются непредусмотренным самовведением 240 мг кодеина в 12.00. На рис. 1 показано, что в течение периода инфузии физиологического раствора на 8-й день не наблюдалось сколько-нибудь существенных изменений давления крови и температуры и имело место постепенное увеличение значения ПИА. В течение ранних периодов инфузии отмечалось заметное снижение частоты пульса и, как более подробно показано на рис. 3, увеличение частоты дыхания в течение периодов А и Б и резкое снижение скорости дыхания в течение периода В.

Субъективные ощущения и другие эффекты, наблюдаемые во время инфузий физиологического раствора и β-эндорфина, суммированы в табл. 1 и 2. В табл. 1 время 0 соответствует началу периода Б на рис. 2, а в табл. 2 время 0 соответствует началу периода А на том же рисунке. В течение 30-минутного периода, предшествующего введению β-эндорфина, пациент не отмечал у себя каких-либо улучшений при абстиненции умеренной силы (ШС= =—2). Во время инфузии β-эндорфина пациент казался спящим; после пробуждения в конце периода инфузии (0,5 ч) пациент без наводящих вопросов пожаловался на сухость во рту и указал на субъективное улучшение самочувствия. Пятнадцатью минутами позже он отрицал ощущение каких-либо признаков абстиненции, и единственными объективными признаками были редкое миоклоническое вздрагивание и зевота. Через 1 ч он указал, что симпто-

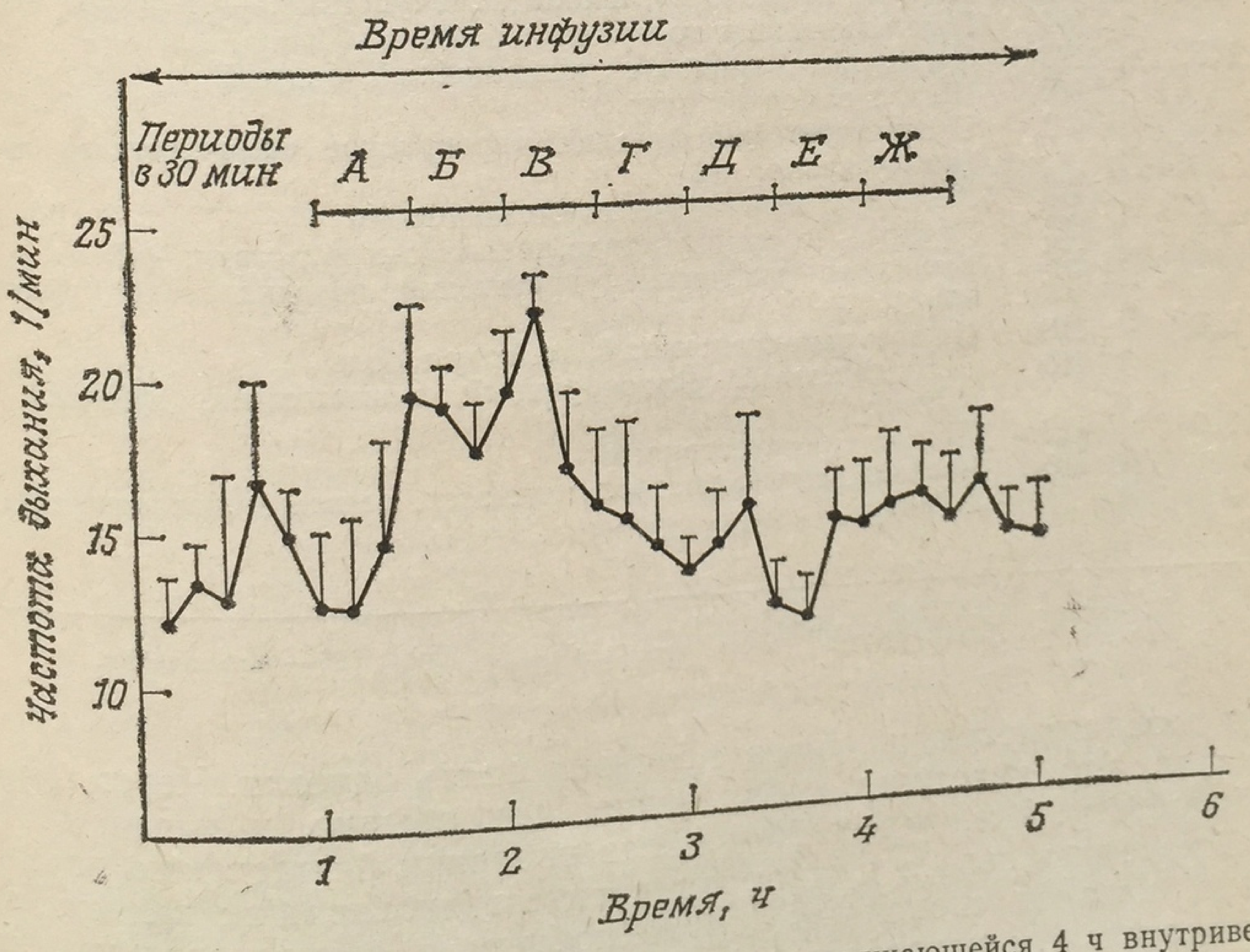


Рис. 3. Изменение частоты дыхания во время продолжающейся 4 ч внутривенной инфузии водного раствора глюкозы и после этого периода. Данные представляют собой среднее значение ± средняя ошибка для каждого 10-минутного периода. Физиологический раствор (3,0 мл) добавляли к инфузионному резервуару в начале периодов А — Е и 5,0 мг морфинсульфата добавили в начале периода Ж. А — Е — физиологический раствор, Ж — 5,0 мг морфинсульфат.

Таблица 1

Хронология сообщений пациента и результатов наблюдений во время инфузии β-эндорфина и после этого периода

Часы	Сообщения и наблюдения	
—0,25	ПВ[1]	Шкала самочувствия: —2, головная боль, боль в боку
	Нб	Миоклонические судороги, некоммуникабельность, обильные выделения из носа, напряженный, настороженный
0,00[2]	Нб	Глаза закрыты, 1—2 миоклонические судороги в минуту
0,25	Нб	Проснулся после легкого сна
	ПВ	Минимальное облегчение абстиненции
0,35	Нб	Легкий сон, легко прерываемый для измерений, сонный, расслабленный, минимальные физические признаки абстиненции
0,50	СС	Сухость во рту
	ПВ	«Теперь лучше», отсутствует боль в боку, облегчение, чувство комфорта, отсутствие головной боли
0,75	ПВ	Жалоб нет, «это полностью прошло», жажда, шкала самочувствия; 0
	Нб	Очень разговорчивый, без настороженности, дружелюбный, минимальные физические признаки абстиненции, пьет холодный чай
1,00	СС	«Это возвращается», шкала самочувствия: —1
	Нб	Принимал пищу во время ленча
1,5	Нб	Очень разговорчивый, дружелюбный, бодрый
	ПВ	Шкала самочувствия: 0
2,5	СС	Совершенно нормальный, «прекрасное самочувствие», шкала самочувствия: +2
	ПВ	Не нужно ничего, похожего на героин
4,0	СС	Прекрасное самочувствие, шкала самочувствия: +2
	Нб	Выполнил физические упражнения, изредка зевает, разговорчив
6,0	ПВ	Шкала самочувствия: 0, головная боль
	Нб	Расслабленный, разговорчивый, минимальные признаки абстиненции
10,0	ПВ	Шкала самочувствия: 0
	Нб	Расслабленный, смотрел телевизор, редкие моноклонические судороги

[1] СС — самопроизвольное сообщение; ПВ — прямой вопрос; Нб — наблюдения.
[2] Начало периода Б.

мы возвращаются, но через 1,5 ч они опять исчезли. Через 4 ч он сказал, что чувствует себя лучше, чем обычно, и начал делать гимнастику. Между 2 и 10 ч после введения β-эндорфина изредка наблюдались зевота и миоклонические вздрагивания; пациент, однако, казался спокойным, дружелюбным и словоохотливым. Наблюдатель (с использованием слепого метода) сообщил, что введение препарата подавило абстиненцию, и специально отметил, что пациент кажется менее возбужденным. Через 15 ч после введения β-эндорфина сиделка отметила, что пациент стал беспокойным и суетливым; ему дали 7,5 мг морфинсульфата.

Пациент отрицал наличие каких-либо субъективных ощущений, вызванных введением β-эндорфина, помимо улучшения состояния, и особенно отрицал наличие эйфории, дисфории и галлюцинаций. Он не мог идентифицировать никаких эффектов β-эндорфина, сходных с каким-либо из эффектов, вызываемых наркотиком. Обзор симптомов не выявил никаких дополнительных эффектов препарата, и мы не наблюдали каких-нибудь аномальных движений или изменений рефлексов.

Пациент сообщил также о субъективном улучшении состояния в период инфузии физиологического раствора (табл. 2). В течение первого часа он казался спящим, и его сон прерывался редкими миоклоническими вздрагиваниями. В конце первого часа он отметил определенное улучшение, продолжавшееся примерно 15 мин. Это заявление совпадало по времени с увеличением частоты дыхания. В течение последующих двух часов его сообщения указывали на умеренные симптомы, что отражало улучшение его субъективного состояния по сравнению с тем состоянием, которое было

Таблица 2

Хронология сообщений пациента и результатов наблюдений в период инфузии физиологического раствора

Часы	Сообщения и наблюдения	
0,00[1]	ПВ[2]	Шкала самочувствия: —2, озноб
	Нб	Зевота, риноррея, беспокойство, случайные миоклонические судороги, с трудом вовлекается в разговор
0,10	Нб	Случайные миоклонические судороги
0,25	ПВ	Без изменений, «усталость»
	Нб	Глаза закрыты, накрылся одеялом
0,75	Нб	Легкий сон
1,0	ПВ	Озноб и головная боль, «в остальном нормально», «самочувствие ненадолго стало хорошим», «определенно лучше», шкала самочувствия: 0
	Нб	Разговорчивый, зевота, облегчение
	Нб	Разговорчивый, речь связная, облегчение, зевота, редкие миоклонические судороги
1,25	СС	«Это теперь возвращается», «все начинается снова», шкала самочувствия: —1
1,75	СС	«Чувствую себя хуже», боли в боку, головная боль, шкала самочувствия: —1
	Нб	Зевота, беспокойство, риноррея, снижение коммуникабельности
2,5	СС, Нб	Никаких изменений по сравнению с 1,75
3,0	ПВ	«Может быть, полегчает», не нужно ничего типа героина», «я еще болен», шкала самочувствия: —1
	Нб	Потливость, зевота, дружелюбен, легко вступает в разговор, речь связная, не голоден, редкие миоклонические судороги

[1] Начало периода А.

[2] СС — самопроизвольное сообщение; ПВ — прямой вопрос; Нб — наблюдение.

у него перед инфузией. Все это время мы продолжали наблюдать признаки умеренной абстиненции. Следует отметить, что снижение частоты дыхания в течение периода В было равно по величине уменьшению частоты дыхания при введении β-эндорфина. Наблюдатель с использованием слепого метода отметил четкое снижение абстиненции при инфузии физиологического раствора. При сравнении с результатами, полученными при введении β-эндорфина, наблюдатель отметил, что величина эффекта физиологического раствора была такой же, как и β-эндорфина, но продолжительность ответа на физиологический раствор была значительно короче.

Обсуждение

Главным доводом в пользу того, что β-эндорфин обладает способностью подавлять абстиненцию у человека, является снижение частоты дыхания и значения ПИА, сообщение пациента об улучшении самочувствия и сообщение наблюдателя (по слепому методу) о состоянии пациента в течение 30 мин после введения β-эндорфина. Однако, поскольку мы показали, что инфузия физиологического раствора также может приводить к заметному улучшению субъективных и объективных параметров, очевидно, что вопрос этот нуждается в дальнейшем исследовании.

При рассмотрении всех оцениваемых нами параметров наркотической абстиненции наиболее четким индикатором возможного действия β-эндорфина оказывается частота дыхания. Мы не наблюдали сокращения зрачков, и эйфория также не была отмечена. Результаты этого исследования и исследования других четырех пациентов не выявили каких-либо острых неблагоприятных эффектов β-эндорфина.

Приняв, что β-эндорфин оказывал-таки действие на нашего пациента, рассмотрим теперь вопрос о продолжительности эффекта. Наблюдая за поведением пациента, мы пришли к выводу, что его состояние улучшается на период по крайней мере 6, а может быть, и 10 ч. Вместе с тем очевидно, что зевота и миоклонические вздрагивания у пациента обнаруживаются в течение всего этого периода. До тех пор пока не будет закончен анализ мочи, мы не можем сделать окончательного вывода о том, что пациент не принял тайком от нас наркотика между 4 и 10 ч после введения β-эндорфина. Тот факт, что пациент предпринял попытку самостоятельного приема кодеина на 7-й день, уменьшает, но не исключает такую возможность.

На основании молярных отношений, вычисленных по значениям ED_{50} для анальгезии, внутривенно введенный β-эндорфин оказывается у грызунов в 3—4 раза более эффективным, чем внутривенно введенный морфин [14]. Если предположить, что такое же молярное отношение годится для подавления абстиненции у человека, то получается, что доза β-эндорфина, эквивалентная 10 мг морфинсульфата, равна приблизительно 30 мг; именно такая доза использовалась в наших исследованиях.

Второго пациента исследовали по такому же протоколу, и полученные результаты оказались совершенно сходными с изложенными здесь; у второго пациента также отмечалась реакция и на β-эндорфин, и на физиологический раствор. В связи с этим представляется очевидным, что для получения несомненных данных о способности β-эндорфина подавлять наркотическую абстиненцию следует строго применять двойной слепой метод. В настоящее время наши усилия направлены на получение кривой доза — ответ для β-эндорфина, на изучение запаздывающих эффектов β-эндорфина и его влияния на аффективные нарушения и различные состояния, сопровождающиеся болевыми ощущениями.

* *
*

Мы выражаем свою признательность Патриции Сандерс за помощь при клинических исследованиях и за перепечатывание рукописи.

Список литературы

1. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemin R.* Science, **194**, 630—632 (1976).
2. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Deakin J. F. W., Wendlandt S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 748—754 (1977).
3. *Graf L., Sekely J. I., Ronai A. Z., Dunai-Kovacs Z., Bajusz S.* Nature, **263**, 240—241 (1976).
4. *Himmelsbach C. K.* Publ. Hlth. Rep. Wash., Suppl. **125** (1977).
5. *Li C. H., Chung D.* Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 1145—1148 (1976).
6. *Li C. H., Lemaire S., Yamashiro D., Doneen B. A.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **71**, 19—24 (1976).
7. *Li C. H., Chung D., Doneen B. A.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **72**, 1542—1547 (1976).
8. *Li C. H., Yamashiro D., Tseng L.-F., Loh H. H.* J. Med. Chem., **20**, 325—328 (1977).
9. *Li C. H., Chung D.* Nature, **260**, 622—624 (1976).
11. *Loh H. H., Li C. H.* In: ACTH and Related Peptides, Symposium, Nov. 17—19, 1976, N. Y. Acad. Sci.. **297**, 115 (1977).
10. *Loh H. H., Tseng L.-F., Wei E., Li C. H.* Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 2895—2898 (1976).
12. *Martin W. R., Jasinski D. R., Haertzen C. A., Kay D. C., Jones B. C., Mansky P. A., Carpenter R. W.* Arch. Gen. Psych., **28**, 286—295 (1973).
13. *Meglio M., Hosobuchi Y., Loh H. H., Adams J. E., Li C. H.* Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 774—776 (1977).
14. *Tseng L.-F., Loh H. H., Li C. H.* Nature, **263**, 239—240 (1976).
15. *Tseng L.-F., Loh H. H., Li C. H.* Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 4187—4189 (1976).
16. *Wei E., Loh H. H.* Science, **193**, 1262—1263 (1976).

ОПОСРЕДУЮТ ЛИ ЭНДОРФИНЫ АКУПУНКТУРНУЮ АНАЛЬГЕЗИЮ?

Б. ПОМЕРАНЦ

(B. Pomeranz)

Эксперименты с налоксоном

Мы начали акупунктурные исследования в 1974 г. путем внеклеточной регистрации электрических сигналов от нейронов болевого тракта спинного мозга кошки (рис. 1). В норме при дотрагивании до кожи клетки пятого слоя спинного мозга продуцируют низкочастотные импульсы (около 50 имп./с), которые передаются в высшие отделы мозга. Когда стимуляция кожи оказывается достаточно сильной, чтобы вызвать болевые ощущения, частота импульсации этих клеток увеличивается (до 400 имп./с), что служит для мозга сигналом о большой интенсивности стимулов [7]. Таким образом, частота импульсации этих клеток спинного мозга отражает интенсивность стимуляции кожи. На рис. 2 показана диаграмма измерения скорости импульсации одной из клеток пятого слоя.

В настоящем исследовании мы попытались выяснить, влияет ли электроакупунктура на клетки спинного мозга. Мы проводили электроактивацию акупунктурных игл при напряжении 4 В с частотой 4 имп./с. Длительность импульса составляла 0,1 мс, а курс акупунктуры продолжался 30 мин. В течение первых 5 мин не наблюдалось никакого эффекта: частота импульсации клеток спинного мозга оставалась нормальной. Между 10-й и 30-й мин наблюдалось резкое снижение частоты импульсации, вызываемой болевыми стимулами; реакция клеток на легкое касание кожи при этом не изменялась (рис. 2, *Б*). «Болевой» код модифицировался, тогда как код «касания» не изменялся. Этот эффект акупунктуры достигал максимального выражения через 20 мин (среднее значение, полученное на 50 клетках; рис. 3). И хотя иглы удалялись из кожи через 30 мин, реакция клеток не восстанавливалась вплоть до 60—90 мин после начала акупунктуры рис. 2, *В* и 3) [9].

Поскольку клетки спинного мозга играют важную роль в передаче болевого сигнала в мозг, то вполне возможно, что подавлением их ответа может объясняться облегчение боли при акупунктуре без изменения других ощущений (например, ощущения дотрагивания). Недоумение, однако, вызывали у нас длительное запаздывание эффектов акупунктуры (10 мин) и длительное время восстановления (60 мин). Такие временны́е параметры не соответствовали простым ингибиторным механизмам нервов, которые обычно заканчиваются в доли секунды. Эти длительные временны́е параметры напоминали результаты клинических наблюдений в Китае, где иглоукалывание пациентов продолжалось в течение 20 мин до начала операции. Кроме того, в исследовании, проведенном в Швеции с использованием тщательных контролей, сообщалось о постепенном возникновении акупунктурной анальгезии в течение 60 мин иглоукалывания (они измеряли болевые пороги на зубах добровольцев — учащихся стоматологического отделения) [2]. Более того, анальгезивное состояние в их исследованиях сохранялось в течение 35 мин после удаления игл.

Этот вызывающий недоумение промежуток времени начал обретать смысл в 1975 г.: в связи с открытием эндорфинов мы

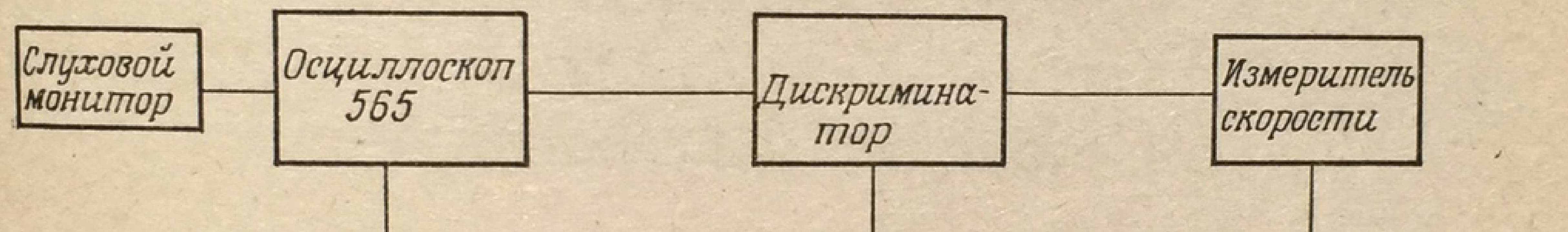

Слуховой монитор
Осциллоскоп 565
Дискриминатор
Измеритель скорости
Запасающее устройство 5013N
Компьютер 1072
Запасающее устройство 5013N
Предусилитель
Маленькие волокна
Большие волокна
I-II III
IV
V
VI
X
VIII
IX
Кожа
Ущемление

Рис. 1. Схематическое изображение метода внеклеточной регистрации, используемого для прослеживания за одиночным нейроном в пятом слое спинного мозга кошки, анестезированной хлоралозой.
Выход измерителя скорости подается на запоминающий осциллоскоп; пример приведен на следующем рисунке.

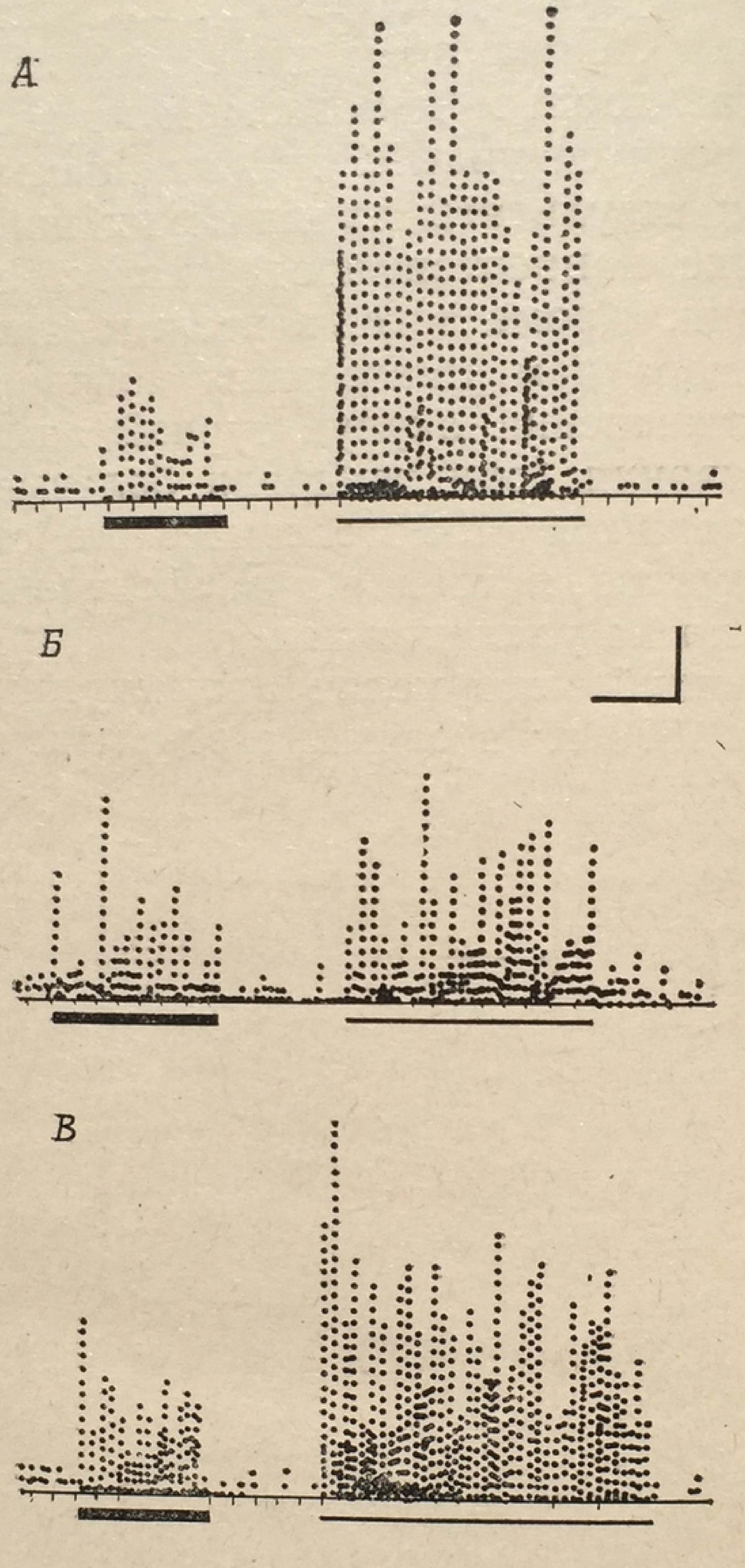


Рис. 2. Акупунктура снижает электрические ответы одиночного нейрона спинного мозга на болевые раздражения.

Каждая точка соответствует одному нервному импульсу. По мере продвижения луча осциллоскопа слева направо он останавливается в одном положении в течение 0,1 с, и точки прибавляются к вертикальному ряду; луч затем переходит к следующему ряду, и точки генерируются в течение следующих 0,1 с и так далее. *А*. Показаны нормальные реакции клетки до акупунктуры. *Б*. Та же клетка через 30 мин после применения акупунктуры. *В*. Та же клетка при частичном восстановлении через 50 мин после начала акупунктуры (через 20 мин после удаления игл). Горизонтальные черточки под осциллограммой показывают продолжительность стимуляции кожи, которая активирует этот нейрон: толстая черточка соответствует легкому касанию, а тонкая черточка — болезненному уколу иглой.

L-образная шкала показывает масштабы (5 с по горизонтали и 50 точек/с по вертикали).

могли постулировать, что акупунктура вызывает медленное высвобождение эндорфинов, которые в свою очередь обусловливают анальгезию. Для проверки этой гипотезы мы инъецировали внутривенно налоксон (0,3 мг/кг) 9 кошкам, чтобы попытаться подавить действие акупунктуры на клетки спинного мозга. Каждый нейрон анализировался в соответствии со следующим протоколом: а) исходный контроль; б) 30 мин акупунктурного воздействия; в) 60 мин восстановления; г) инъекция налоксона (0,3 мг/кг, в/в) с последующим вторым 30-минутным акупунктурным воздействием и д) 30 мин восстановления. На рис. 4 показана полная блокада эффектов акупунктуры, вызываемая налоксоном в единичной клетке. На рис. 5 показаны усредненные результаты, полученные с налоксоном на 9 клетках.

Для дальнейшей проверки этой гипотезы мы разработали пример акупунктурной анальгезии на бодрствующих мышах; мы измеряли латентность писка у мышей, подвергнутых воздействию горячей лампы. Двадцатиминутная акупунктура вызывает увеличение латентности писка (анальгезия), причем этот эффект блокируется налоксоном (1 мг/кг, внутрибрюшинно). На рис. 6 представлена временна́я зависимость этих результатов. Показаны также два контрольных эксперимента. Одной группе мышей вводили внутрибрюшинно физиологический раствор, и это не подавляло

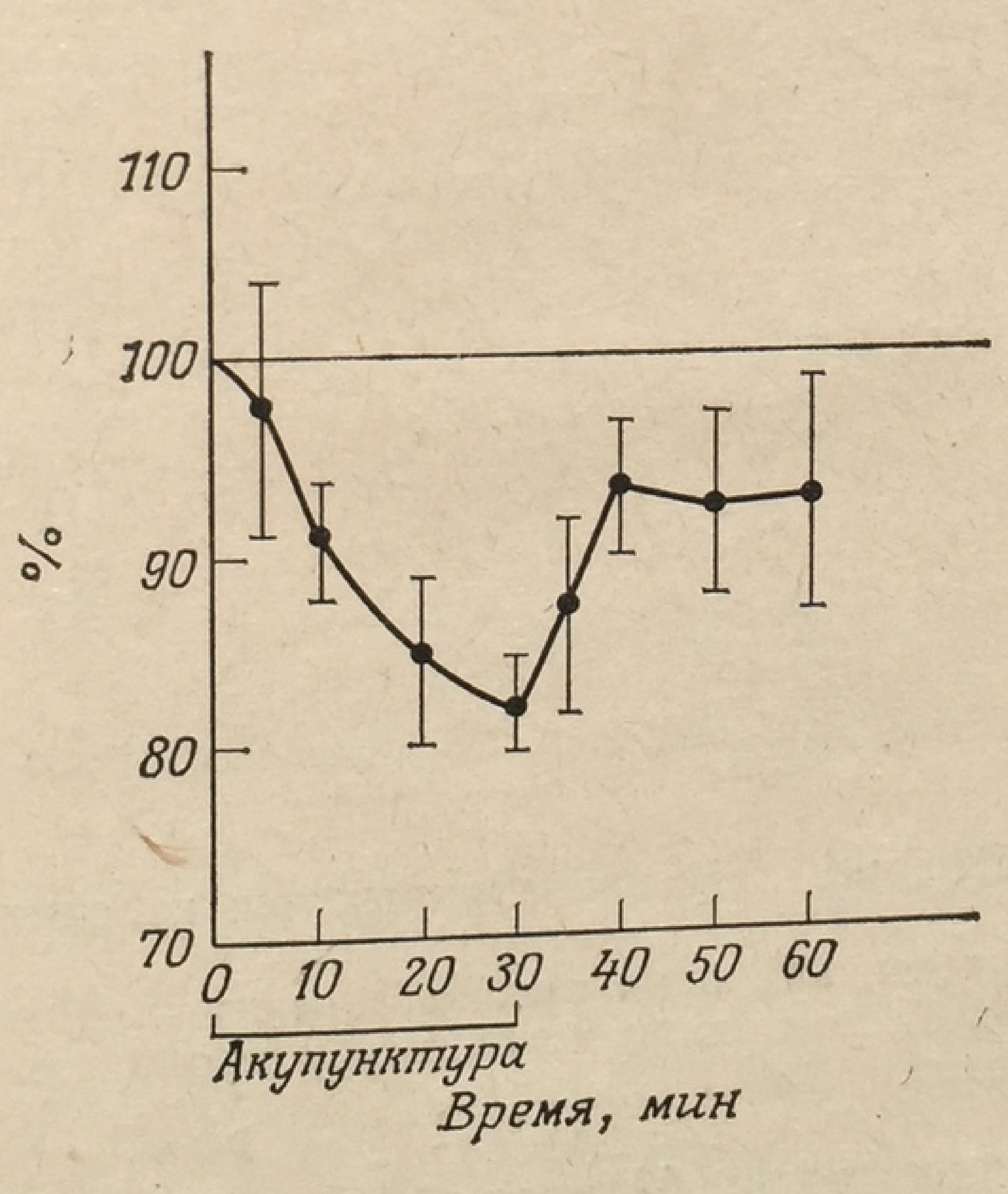


Рис. 3. Акупунктура снижает число импульсов, вызванных болевыми стимулами.

Каждую клетку прослеживали в течение 60 мин и ответы 50 клеток усредняли для построения этого графика. Вертикальные черточки показывают среднюю ошибку. Акупунктура продолжалась 30 мин. По оси ординат отложена частота импульсации клеток в % от исходной.

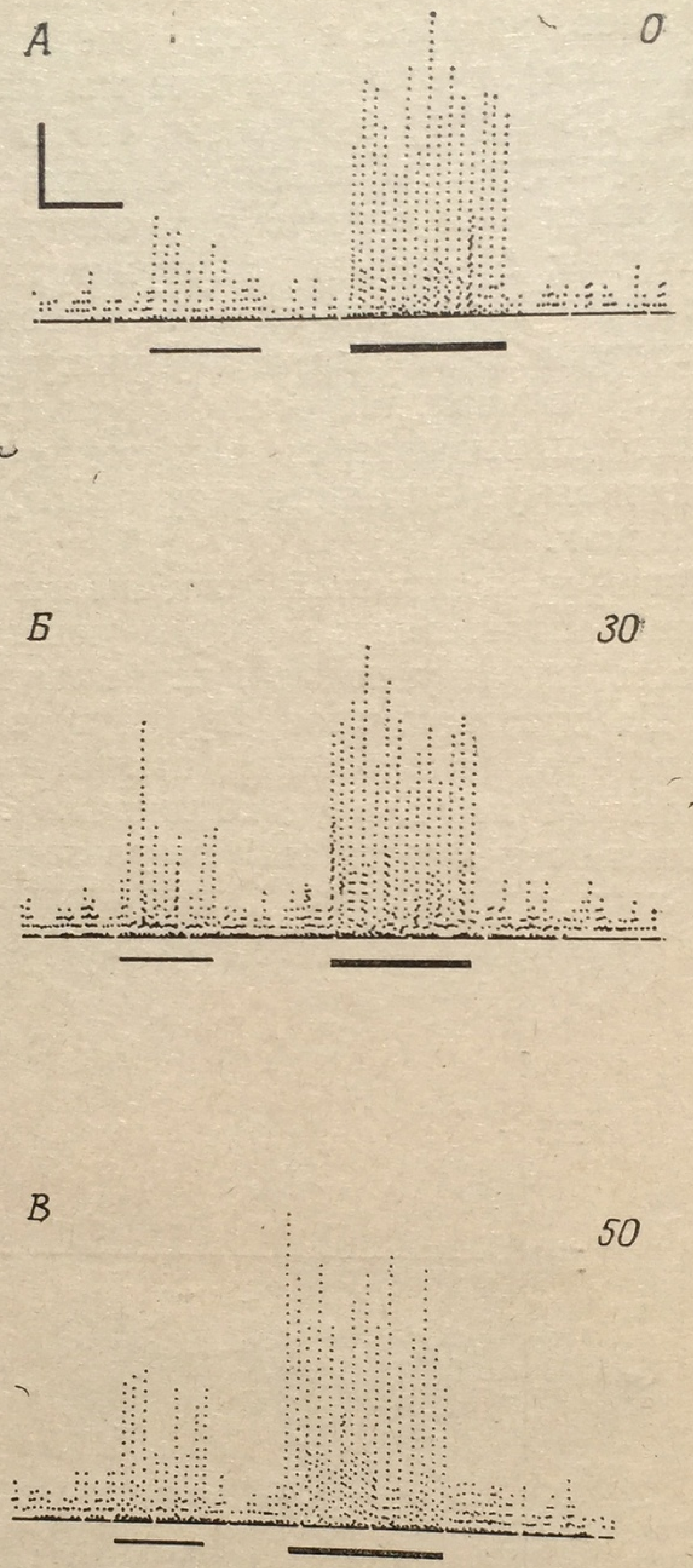


Рис. 4. Налоксон блокирует действие акупунктуры на одиночный нейрон спинного мозга.
Осциллограммы получены, как и на рис. 2. 30-минутный ответ оказывается таким же, как и исходный, поскольку акупунктуру проводили на фоне внутривенного введения налоксона.

акупунктурной анальгезии. У второй группы мышей ложная акупунктура в неакупунктурные участки не вызывала анальгезии [8]. Во время проведения этих экспериментов были опубликованы предварительные результаты Мейера [5] о блокировании налоксоном акупунктурной анальгезии у человека. Недавно эти данные опубликованы в полном объеме [6].

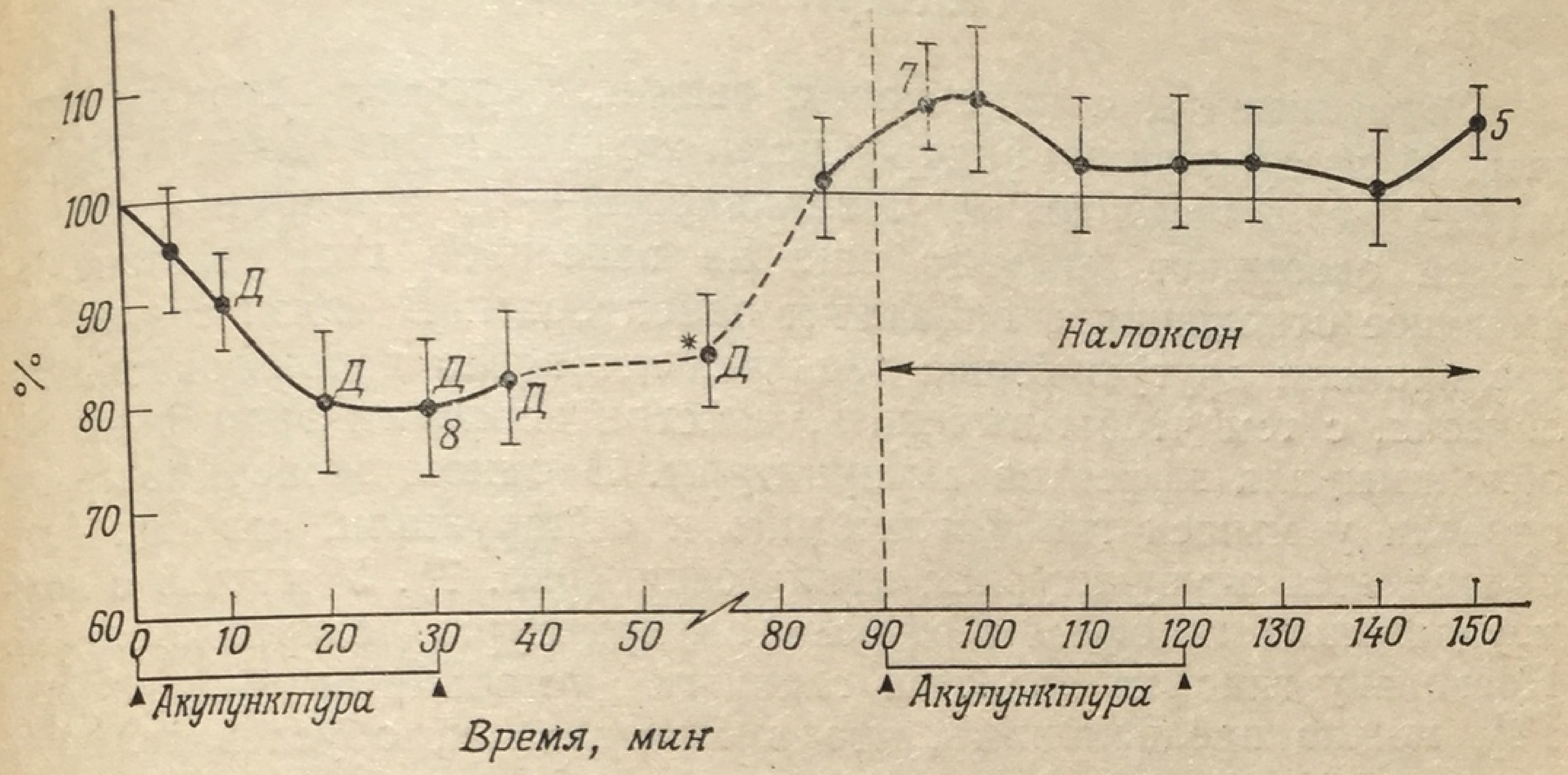


Рис. 5. Налоксон блокирует действие акупунктуры на 9 нейронах спинного мозга кошки.

Каждая клетка прослеживалась в течение 150 мин; средние значения (и средняя ошибка) представлены на графике так же, как на рис. 3. Д — достоверно на уровне 0,05 (используя парный тест значимости Вилкоксана) при сравнении каждой точки со значением 100%. Налоксон вводили в течение второго сеанса акупунктуры. По оси ординат отложены значения частоты импульсации в % от исходного.

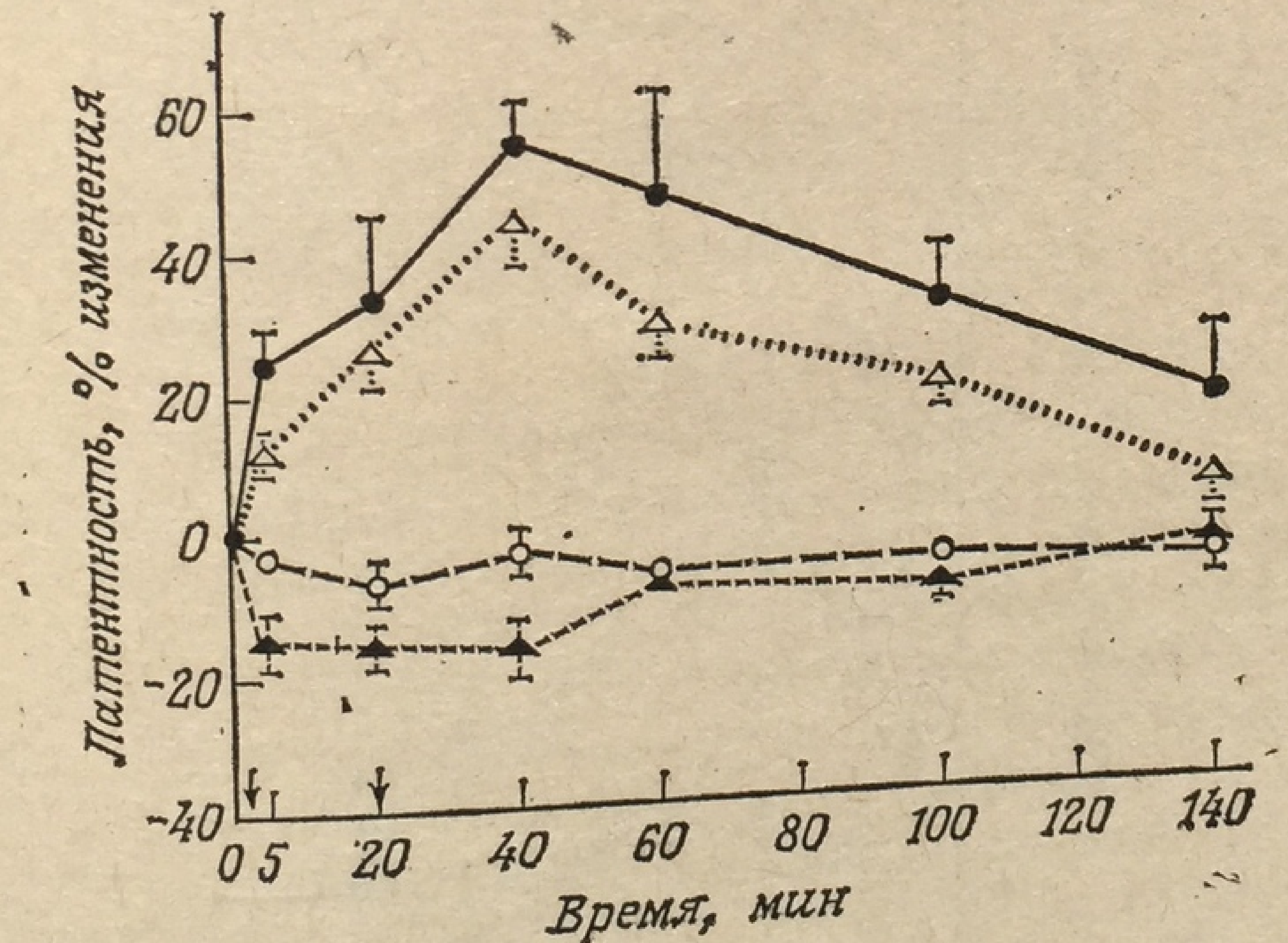


Рис. 6. Налоксон блокирует у бодрствующих мышей акупунктурную анальгезию, оцениваемую по латентности писка при болевых стимулах.

Темные кружки — мыши, получавшие только акупунктуру. Светлые треугольники — акупунктура + инъекция физиологического раствора. Светлые кружки — ложная акупунктура. Темные треугольники — акупунктура + налоксон. Каждая кривая построена на основании средних значений, полученных на 10 мышах. Акупунктура начиналась во время 0 и продолжалась 20 мин. Увеличение латентности писка, вызванное акупунктурой (темные кружки, верхняя линия), подавляется налоксоном (темные треугольники, нижняя линия).

Гипофизэктомия

Эксперименты с налоксоном свидетельствуют в пользу гипотезы об опосредовании эндорфинами акупунктурной анальгезии, но отнюдь не доказывают ее правильности — не исключено, что налоксон оказывает какое-то еще не известное нам действие, не имеющее отношения к опиатным рецепторам. В связи с этим мы предприняли другую серию экспериментов без использования налоксона, с тем чтобы выяснить, действительно ли эндорфины необходимы для эффектов акупунктуры. В одном эксперименте мы провели у мышей гипофизэктомию и обнаружили, что при этом подавляется акупунктурная анальгезия (рис. 7). У мышей с ложноудаленным гипофизом эффект акупунктуры сохраняется [9]. Поскольку гипофиз является главным источником β-эндорфина [4], можно предположить, что в механизмах, обусловливающих развитие анальгезии при акупунктуре, участвуют гипофизарные эндорфины.

Генетические исследования

Другая проверка гипотезы была предпринята с использованием генетических исследований. Как указывают Барон и др. [3], линия мышей CBXK характеризуется дефицитом опиатных рецепторов, о чем свидетельствует низкая чувствительность к мор-

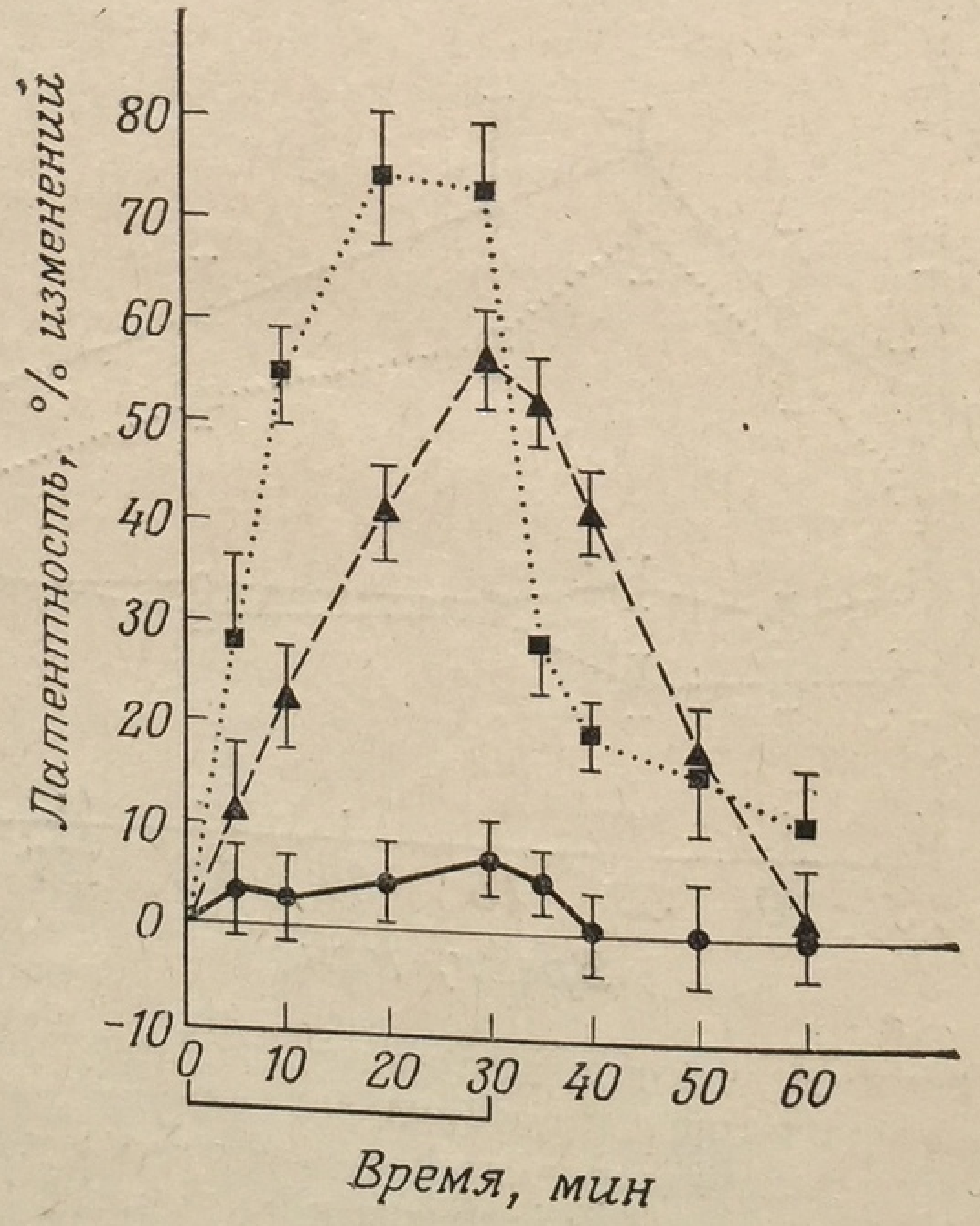


Рис. 7. Гипофизэктомия подавляет акупунктурную анальгезию у мышей, оцениваемую по латентности писка: квадраты — мыши с интактным гипофизом; треугольники — ложногипофизэктомированные мыши; кружки — мыши с удаленным гипофизом. Акупунктура продолжалась от 0 до 30 мин.

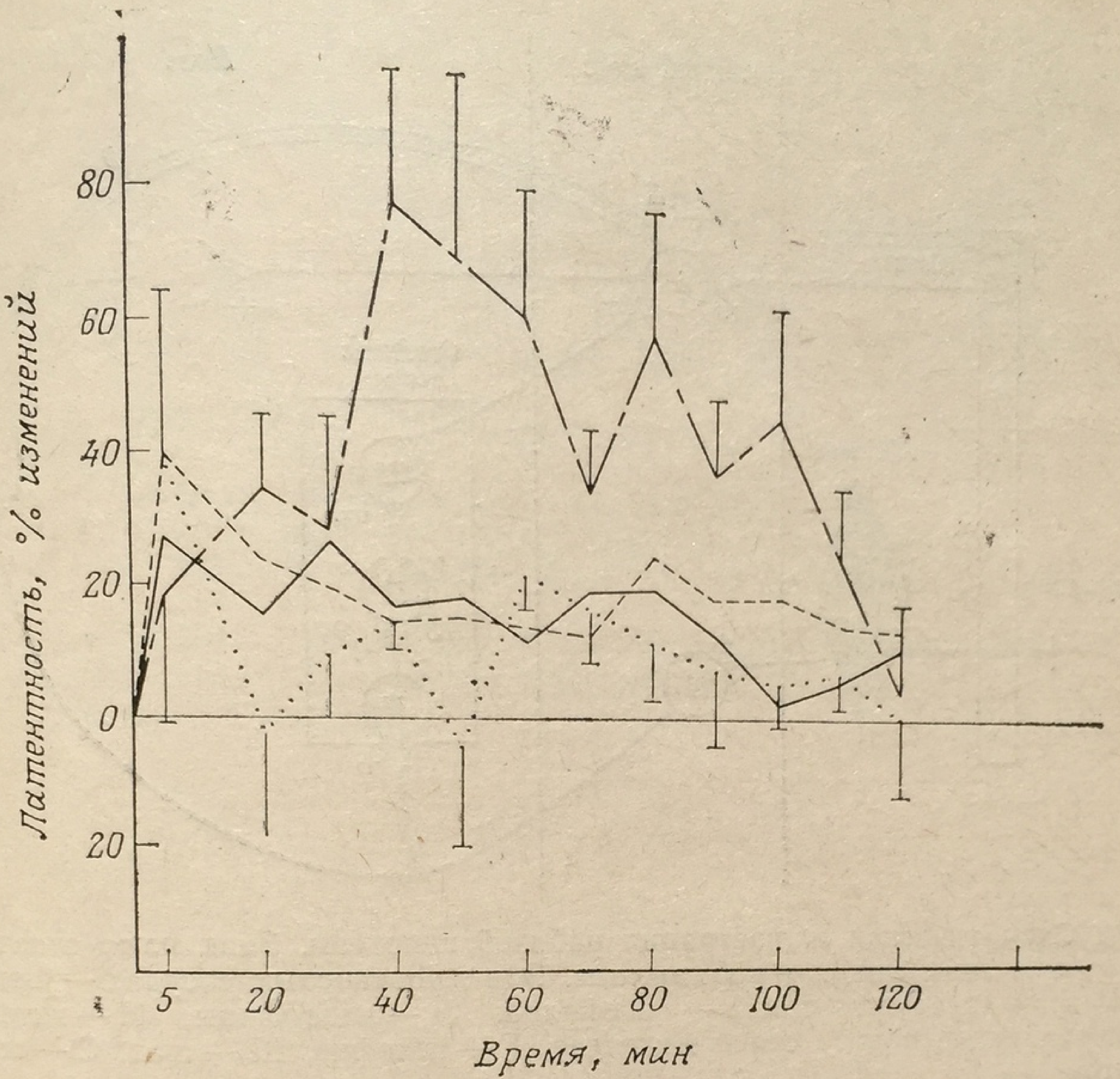


Рис. 8. Генетические исследования, показывающие, что у мышей C57BL/By (верхняя кривая) развивается акупунктурная анальгезия, а у мышей СВХК (нижняя сплошная кривая) — нет.
Точечная кривая показывает эффект сочетания налоксона (1 мг/кг, подкожно) и акупунктуры у мышей обеих линий.

фину in vivo и низкая рецепторная активность in vitro, определяемая с помощью радиорецепторного теста. Поскольку эти мыши получены путем обратного скрещивания, мы могли использовать родительские линии в качестве контроля; мыши одной из родительских линий C57BL/By характеризуются нормальной чувствительностью к морфину и высокой рецепторной активностью in vivo [3]. На рис. 8 показаны предварительные результаты наших генетических экспериментов с акупунктурой. У мышей C57BL наблюдается нормальная акупунктурная анальгезия, блокируемая налоксоном, тогда как у мышей СВХК после акупунктуры развивается только слабая анальгезия, либо анальгезия не наступает совсем.

Содержание эндорфинов

Для дальнейшей проверки гипотезы об участии эндорфинов в акупунктуре мы измеряли содержание эндорфинов в мозгу мышей и кроликов, чтобы выяснить, изменяется ли его содержание при

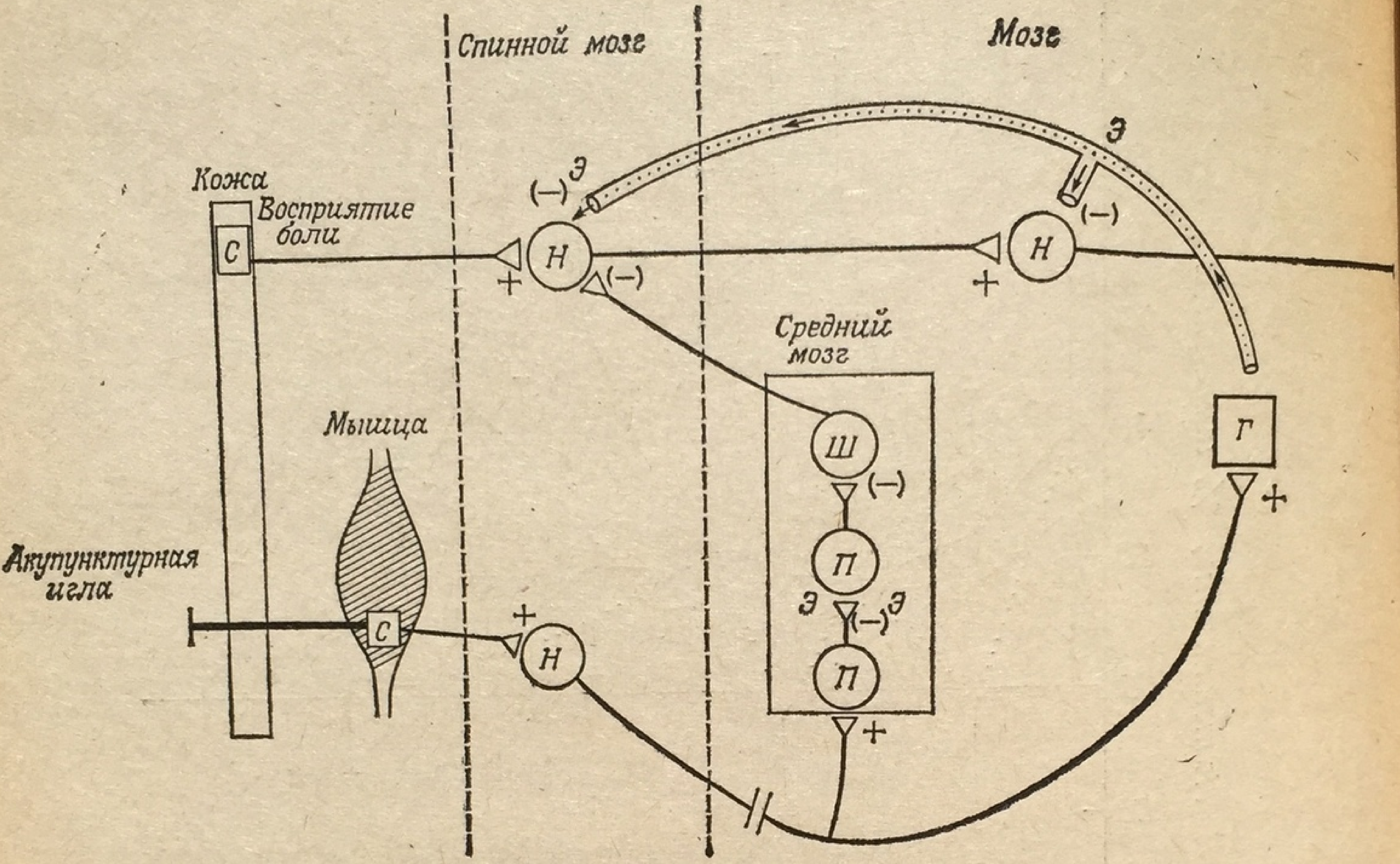


Рис. 9. Схематическая иллюстрация рабочей гипотезы. Знак плюс означает возбуждение, а знак минус — торможение. Э в кровеносных сосудах — β-эндорфин, в синапсах среднего мозга — энкефалин. Э — эндорфины, Н — интернейрон, П — периакведуктальное серое вещество, Г — гипофиз, Ш — шов, С — сенсорный рецептор.

акупунктуре. Предварительные результаты, полученные на 10 мышах с помощью радиорецепторного теста, не выявили изменений в общем содержании эндорфинов мозга после 30 мин электроакупунктуры. В других докладах, представленных в этом издании, приведены данные об увеличении содержания эндорфина в СМЖ человека после акупунктуры [10] или стимуляции мозга [1]. В настоящее время мы проводим измерения содержания эндорфинов в крови и СМЖ мышей и кроликов.

Заключение

Совокупность приведенных результатов (данные по налоксону, результаты гипофизэктомии, генетические данные и результаты анализа СМЖ) убедительно свидетельствует в пользу гипотезы об участии эндорфинов в акупунктурной анальгезии.

Наша рабочая гипотеза отражена на рис. 9. Акупунктура активирует глубинные мышечные рецепторы, что побуждает сенсорную систему высвобождать эндорфины из гипофиза (или среднего мозга). Гипофизарные эндорфины высвобождаются в кровь и возвращаются в мозг для блокирования синаптической передачи в ноцицептивном тракте. Возможно также, что эндорфины в среднем мозгу служат медиаторами системы контроля боли, и этот центральный регуляторный механизм может быть активирован акупунктурой.

Список литературы

1. *Akil H.* Данное издание.
2. *Andersson S. A., Holmgren E.* Amer. J. Chin. Med., **3**, 311—334 (1975).
3. *Baron A., Shuster L., Eleftheriou B. E., Bailey D. W.* Life Sci., **17**, 633—640 (1975).
4. *Cox B. M., Opheim K. E., Techemacher H., Goldstein A.* Life Sci., **16**, 1777—1785 (1975).
5. *Mayer D. J.* Neurosci. Res. Prog. Bull., **13**, 98 (1975).
6. *Mayer D. J., Price D. D., Rafii A.* Brain Res., **121**, 368—372 (1977).
7. *Pomeranz B., Wall P. D., Weber W. V. J.* Physiol. (Lond.), **199**, 511—532 (1968).
8. *Pomeranz B., Chiu D.*, Life Sci., **19**, 1757—1762 (1976).
9. *Pomeranz B., Cheng R., Law P.* Expt. Neurol., **54**, 172—178 (1977).
10. *Terenius L.* Данное издание.

ВЛИЯНИЕ НАЛОКСОНА НА ВЫЗЫВАЕМУЮ АКУПУНКТУРОЙ АНАЛЬГЕЗИЮ У НАРКОМАНОВ

Е. МАЛИЦИЯ, Дж. АНДРЕУЧЧИ, Р. СЕРБО, Дж. КОЛОМБО

(E. Malizia, G. Andreucci, R. Cerbo, G. Colombo)

Как показали Померанц и Чиу [7], электроакупунктура бодрствующих мышей вызывает анальгезию к болевым тепловым стимулам, выражающуюся в 54%-ном увеличении периода латентности. Подкожная инъекция налоксона полностью предотвращает эту анальгезию, что указывает на участие эндорфинов в этом процессе. Налоксон, вводимый контрольным мышам, вызывает гиперанальгезию у 17% животных, свидетельствуя о выделении эндорфина у нормальных мышей [7]. Эти авторы пришли к выводу, что у контрольных мышей эндорфин высвобождается с низкой базальной скоростью и что эта скорость резко увеличивается под влиянием акупунктуры. Впервые гипотеза о роли эндорфинов в эффектах акупунктуры была предложена Мейером [5]. В другой работе Померанц и др. [8] предположили, что сходную анальгезию вызывают эндорфины, высвобождающиеся из гипофиза. Мейер и др. [6] показали, что налоксон противодействует повышению болевого порога у здоровых людей, подвергнутых игловой акупунктуре без какой-либо экектростимуляции. Было показано, что налоксон обращает анальгезию, индуцированную электростимуляцией перивентрикулярного серого вещества на уровне задней комиссуры среднего мозга у животных [2] и у человека [1]. С другой стороны, по данным Вайссмана и др. [9], налоксон не противодействует анальгезии, индуцированной гипнозом.

Методы электроакупунктуры для лечения наркоманов

Электроакупунктура была применена к заядлым курильщикам табака и препаратов конопли (*Cannabis*), наркоманам и алкоголикам [3, 4]. Для заядлых курильщиков применяли стимуляцию иглоукалыванием двух ушных точек 0 (zero) и 191 (ling), а также традиционных соматических точек, а именно 1VB (Trong-Tse-Tsiano), 8VB (Choae-Kou), 25VB (Tsing-Menn), 4GI (Ro-Kou) и 29GI

(Yng-Siang). Последние две точки стимулировали электрически с помощью аппарата Schackmann Electro Therapy Unit S, 1083 в течение 15—20 мин, используя частоту 30—60 Гц и напряжение достаточно низкое, чтобы не вызывать у пациентов болевых ощущений. В некоторых случаях мы применяли игольчатую стимуляцию двух точек «снятия беспокойства», а именно A1 и A2. Эту процедуру применяли дважды в неделю, так что полный курс включал 4—8 стимуляций.

Для воздействия на алкоголиков и наркоманов мы использовали другие точки рефлексотерапии и иные методы электростимуляции, как описано в соответствующей статье [3]; в этих случаях продолжительность периода стимуляции была больше.

Настоящее исследование представляет собой сравнительное изучение влияния налоксона (ампулы Narcan, 0,3 мг Endo Labs) на пациентов с акупунктурной обработкой; контролем служили те же пациенты, получавшие вместо налоксона физиологический раствор. Исследованная группа включала в себя 15 заядлых курильщиков табака, 5 заядлых курильщиков препаратов конопли и 5 алкоголиков. Мы не включили сюда наркоманов из-за абстинентного синдрома, возникающего при резком прекращении введения наркотика. Пациентам, у которых вырабатывали отвращение к табаку, препаратам конопли или алкоголю, вводили внутривенно Narcan в дозе 0,8 мг за 5 мин до прекращения акупунктурной стимуляции. При последующем акупунктурном воздействии те же пациенты получали по 2 мл физиологического раствора за 5 мин до прекращения сеанса.

Ни у одного из пациентов, получавших налоксон, не выработалось обычного отвращения к привычному яду (табак, препараты конопли или алкоголь); на деле у 19 пациентов (76%) потребность в привычном яде немедленно восстановилась. Этот эффект у алкоголиков и курильщиков табака был выражен сильнее, чем у курильщиков конопли. Только у одного пациента (курильщика табака) введение физиологического раствора вызвало аналогичное действие; у остальных 24 пациентов вырабатывалась обычная реакция на акупунктуру.

На основании проведенного исследования мы пришли к выводу, что налоксон подавляет отвращение к привычному яду, вырабатываемое акупунктурой. Более того, исходя из полученных результатов, можно сделать предположение, что выработка отвращения опосредуется высвобождением эндорфинов или других опиоидных пептидов после акупунктурной стимуляции наркоманов. Сказанное, однако, является только гипотезой.

⁂

Мы выражем благодарность фирме «Endo Corp» за любезно предоставленный нам Narcan.

Список литературы

1. *Adams J. E.* Pain, **2**, 161—166 (1976).
2. *Akil H.* Science, **191**, 961—963 (1976).
3. *Malizia E., Andreucci G., Cerbo R., Colombo G.* Riv. Tossicologia Sper. e Clin. (1977). In press.
4. *Malizia E., Andreucci G., Cerbo R., Colombo G.* Riv. Tossicologia Sper. e Clin. (1977). In press.
5. *Mayer D. J.* Neurosci. Res. Prog. Bull., **13**, 98—104 (1975).
6. *Mayer D. J., Price D. D., Rafii A.* Brain Res., **121**, 368 (1977).
7. *Pomeranz B., Chiu D.* Life Sci., **19**, 1757—1762 (1976).
8. *Pomeranz B., Cheng C., Law P.* Exp. Neurol. (1976). Quoted in No. 7.
9. *Weissmann M. C., Foliaki L., Billings E. L., Billings J. J.* Lancet, **2**, 813—816 (1976).

МОРФИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ГОЛОВНЫМИ БОЛЯМИ

Ф. СИКУТЕРИ, Б. АНСЕЛЬМИ, Ц. КУРРАДИ,
С. МИЧЕЛАЦЦИ, А. САССИ

(F. Sicuteri, B. Anselmi, C. Curradi,
S. Michelacci, A. Sassi)

Идиопатические головные боли, включая мигрень, представляют собой одно из наиболее распространенных заболеваний, обязательным симптомом которых является боль. Обычно считается, что такая боль имеет периферическую природу и обусловлена стимуляцией сосудистых и мышечных ноцицепторов, а также ноцицепторов скальпа и мозговой оболочки; согласно наиболее распространенной гипотезе, головная боль вызывается расширением некоторых артерий мозга. Главным аргументом в пользу такого тезиса может быть облегчение боли сосудосуживающими агентами, такими, как эрготамин [12]. Поскольку у здоровых людей расширение сосудов не вызывает головной боли, есть основания думать, что эрготамин может действовать с помощью других механизмов помимо сосудосуживающего. Высказывалась гипотеза о возможном участии нейромедиаторов, и в частности серотонина, поскольку было показано, что препараты, обладающие антисеротониновым действием, облегчают идиопатическую головную боль (ИГБ) [5]. В последнее время в противовес общепринятой периферической теории высказывалось предположение о центральной природе болей при ИГБ; согласно этим взглядам, четко очерченный нозологический профиль ИГБ является выражением неорганической центральной боли [6, 7]. Другими словами, функция антиноцицептивной системы может быть нарушена не только при наличии общих повреждений, как в случае классического таламического синдрома (органическая центральная боль) [2], но и в случае биохимических отклонений от нормы (неорганическая центральная боль) [7]. Недостаточность серотонина в антиноцицептивной системе рассматривается в связи с этим как возможная биохимическая причина ИГБ [8]. Представление об антиноцицептивной системе как мишени, по которой бьет недостаточность серотонина, кажется неадекватным вследствие облегчения боли антагонистами серотонина, но этой кажущейся неадекватности противоречат данные о том, что эрготамин и другие антагонисты серотонина при испытании в клинических дозах не подавляют серотонинэргических передач ни у животных, ни у человека [1]. В отличие от эрготамина, который резко облегчает ИГБ, но не оказывает действия на другие боли, морфин оказывает слабое или нулевое влияние на мигрень, но является, как известно, наиболее активным анальгетиком при других периферических болях.

Морфиновая анальгезия у животных зависит от снижения до минимума содержания серотонина в определенных участках мозга [3, 4, 9]; в связи с этим можно думать, что взаимодействие серотонина и морфина подтверждает гипотезу о роли недостаточности серотонина в ИГБ. Слабая морфиновая анальгезия при мигрени и обнаруженное позднее существование в мозгу опиоидных пептидов, как возможных модуляторов антиноцицептивной системы, заставили нас исследовать возможное участие морфиноподобных факторов в ИГБ.

Образцы спинномозговой жидкости (СМЖ) получали у четырех пациентов с ИГБ, находящихся в госпитале при отделении клинической фармакологии, и от трех не испытывающих других болевых ощущений пациентов с неврологическими заболеваниями, не связанными с ИГБ. У всех пациентов проводили диагностическую спинальную пункцию. В течение почти что 10 дней ни одному из пациентов не вводили никаких лекарственных препаратов, за исключением указанных в табл. 1. Препараты СМЖ получали при хронической (ежедневной) головной боли в период ее обострения. У больных с ИГБ препараты СМЖ получали в течение асимптоматического периода.

Таблица 1

Морфиноподобные факторы в СМЖ людей, страдающих и не страдающих головными болями

Пациент			Симптомы	Содержание морфиноподобных факторов, пМ/мл
	возраст	пол		
Ф. К.	32	Ж	Хроническая ежедневная головная боль[1]	2,0
Р. Е.	51	М	»	3,3
А. Л.	46	М	»	3,5
П. М.	32	Ж	Мигрень (свободный период)	13,7
И. Р.[2]	23	Ж	Эпилепсия	7,7
П. Л.	23	М	Атрофия мозга	11,4
Б. А.	36	Ж	Синдром Гуиллейна — Барре	55,4

[1] В период обострения.
[2] Получал дифенилгидантоин и мефобарбитал.

Сразу после получения образцы СМЖ разделяли на две различные фракции: первую подвергали ультрафильтрованию и затем замораживали для последующего определения морфиноподобных факторов, проводимого с помощью описанного ранее метода [10],

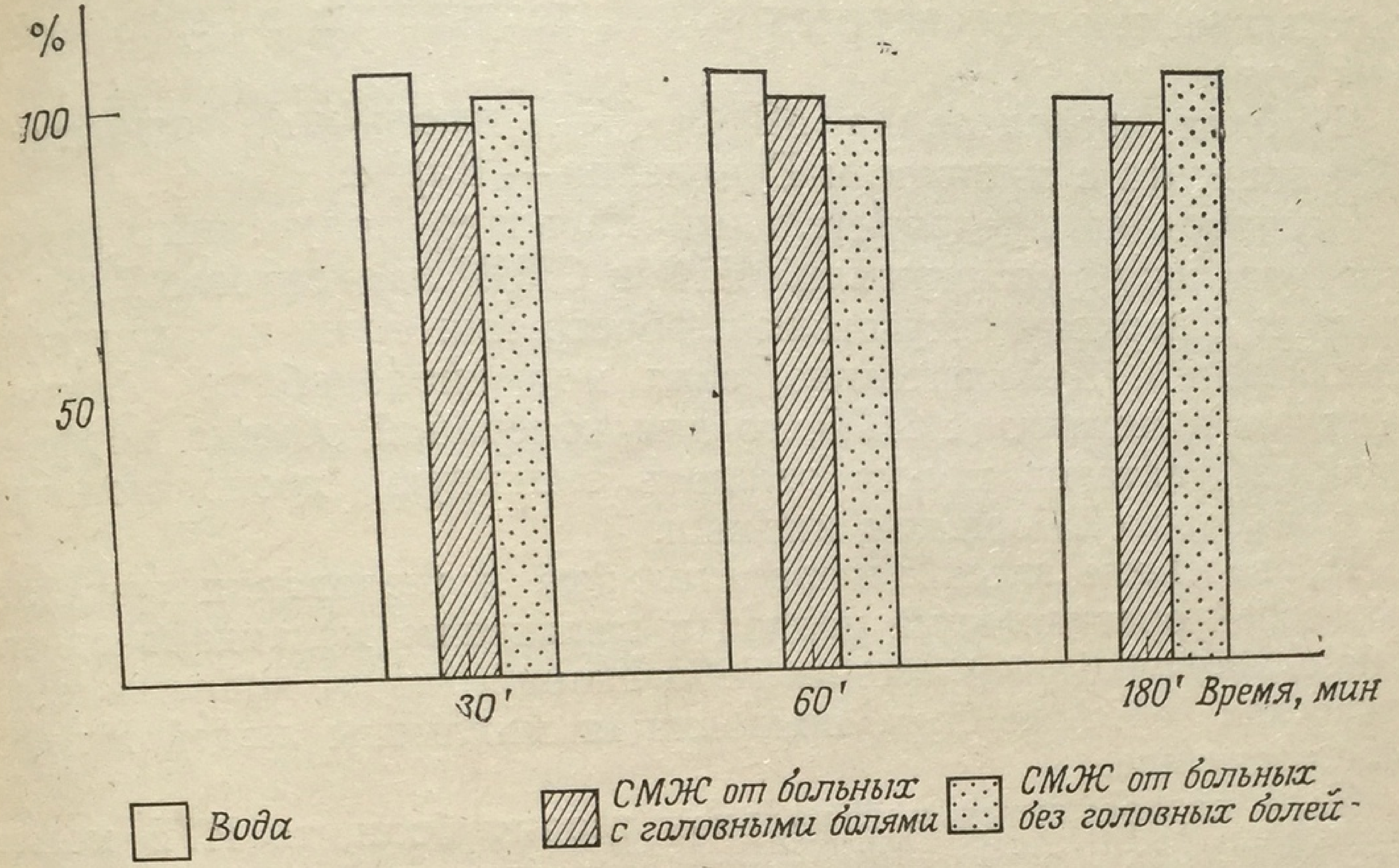


Рис. 1. Отсутствие деградации in vitro (37 °С) ^{3}Н-мет-энкефалина в спинномозговой жидкости.

а вторую замораживали для оценки возможной деградации мет-энкефалина in vitro. В этих экспериментах ^{3}Н-мет-энкефалин инкубировали в СМЖ при 37 °С в течение 3 ч при концентрации 10^{-3} М. Через различные интервалы времени аликвоты инкубационной смеси в 10 мкл анализировали методом тонкослойной хроматографии. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с силикагелем, используя следующую систему растворителей: бутанол — вода — метанол — 2-меркаптоэтанол в соотношении 40 : 30 : 10 : 0,1. Распределение радиоактивности на пластинках определяли путем жидкостного сцинтилляционного просчета соскобов различных зон.

Полученные результаты показаны на рис. 1. Видно, что ^{3}Н-мет-энкефалин не метаболизируется в СМЖ, полученной как от пациентов с ИГБ, так и от пациентов с неврологическими заболеваниями. В самом деле количество пептида не изменяется после 3 ч инкубации.

В табл. 1 приведено общее содержание морфиноподобных факторов (МПФ) в СМЖ, выраженное в пмоль эквивалентов мет-энкефалина.

Наиболее низкое содержание морфиноподобных факторов в СМЖ пациентов, страдающих головными болями, обнаружено в тех случаях, когда пациент в момент взятия СМЖ испытывает головную боль.

У пациентов с ИГБ в препаратах СМЖ, полученных при отсутствии боли, концентрация морфиноподобных факторов в 3—

4 раза выше, чем в препаратах СМЖ, полученных в период обострения боли.

Высокая концентрация МПФ (55,5 пмоль/мл) отмечена в СМЖ пациента с синдромом Гуиллейна — Барре.

Несмотря на предварительный характер полученных результатов, различия в содержании МПФ в СМЖ пациентов с ИГБ, полученных в периоды отсутствия и обострения боли, кажутся обнадеживающими. Действительно, если морфиноподобные факторы участвуют в механизме ИГБ, то для колебаний обмена морфиноподобных факторов можно ожидать типичную хронопатологию, как для головной боли при мигрени.

Приведенные здесь предварительные исследования представляют собой оригинальный подход к выяснению механизма одного из наиболее распространенных заболеваний, каким является идиопатическая головная боль, приводящая миллионы людей в нерабочее состояние.

Если подтвердится центральная теория боли, то ИГБ может быть выделена в четко очерченную нозологическую систему с генетическими нарушениями антиноцицептивной системы. Наиболее привлекательным в настоящее время кажется предположение об участии в этом заболевании пептидэргических и моноаминэргических нейронов.

* * *

Мы выражаем глубокую признательность Данило Бекоцци и мисс Анни Ланг за помощь при переводе материала.

Список литературы

1. *Anselmi B., Del Bianco P. L., De Vos C. J., Galli P., Lamar J. C., Schonbaum E., Sicuteri F., van der Veen F.* Monogr. Neural Sci., **3**, 45—51 (1976).
2. *Dejerine J., Roussy G.* Revue Neurol., **14**, 521—531 (1906).
3. *Harvey J. A., Lints C. E.* Science, **148**, 251—252 (1965).
4. *Samanin R., Gumulka W., Valzelli L. Eur. J.* Pharmacol., **10**, 339—343 (1970).
5. *Sicuteri F.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **15**, 300—307 (1959).
6. *Sicuteri F.* Pharmacol. Res. Comm., 3, 401—407 (1971).
7. *Sicuteri F.*, In: Advances in Pain Research and Therapy, ed. J. J. Bonica and D. Albe-Fessard, pp. 871—880, Raven Press, New York (1976).
8. *Sicuteri F., Anselmi B., Del Bianco P. L.* Psychopharmacologia (Berl.), **29**, 347—356 (1973).
9. *Tenen S. S.* Psychopharmacologia (Berl.). **10**, 204—219 (1967).
10. *Terenius L., Wahlstrom A.* Life Sci., **16**, 1959—1964 (1975).
11. *Terenius L., Wahlstrom A., Linstrom L., Widerlov E.* Neurosci. Lett., **3**, 157—162 (1976).
12. *Wolff H. G.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **7**, 210—278 (1955).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абстиненция, подсчет интенсивности 335
— синдром 259
Аденилатциклаза, влияние D-Ala-метионин-энкефалинамида 207
— — инъекций каиновой кислоты 232
— — опиатов 291
Адреналэктомия и секреция пролактина 195
— содержание β-эндорфина и энкефалинов 99
АКТГ, секреция аденокарциномой 183
— — совместная с β-эндорфином 116
— иммуноцитохимический анализ 135
— и β-липотропин 135
— — опиоиды 183
— фрагмент N-концевой 38
Актиномицин D 279
Акупунктура см. Электроакупунктура
D-Ala-метионин-энкефалинамид, антиноцицептивное действие 201
— и аденилатциклаза 207—208
— — дофаминэргическая передача 237—238
— — кортикальная норадренэргическая система 208
— — налоксон 204
— — налтрексон 236—237, 238
— — обмен дофамина 204
— — содержание cGMP 235, 241
— — — диоксифенилуксусной кислоты 238—241
— каталептогенный эффект 201
Амелетин 21
Амигдалофугальный путь, идентификация энкефалинов 84
Аминопептидаза 58
Анальгезия взаимосвязь с кататонией 327—330
— влияние гипофизэктомии 350
— вызванная стимуляцией 140
— — стрессом 138
— морфином и энкефалинами 287
— обращение налоксоном 138, 318
— при электроакупунктуре 344—353
— роль некоторых участков мозга 70
— эндогенная роль эндорфинов 315
Ангиотензиназа 22
Анодинин 308
Антисыворотки к эндогенным опиоидам 81—82
Апоморфин 215, 229
— влияние на содержание cGMP 231
— индукция вращения у крыс 265
Атрофия церебральная, содержание вазоактивного пептида кишечника 27
Ацетилхолин в мозжечке 26
— — стрионигральном тракте 219—221
— и мускарин 44
— метаболизм влияние β-эндорфина 224
— нейромедиаторные функции 25

Бактитрацин 244
Беспокойство, влияние налоксона 144
Бледный шар, обмен ацетилхолина 224
— — энкефалины 125—129
Боль идиопатическая, морфиноподобные факторы 357—360
Бомбинин 39
Брадикинин 23

Вещество Р в анальгезии 323
— — — системе тройничного нерва 120
— — — стрионигральном тракте 219
— — — экстрапирамидной системе 125
— — и толерантность к морфину 19
— — — энкефалины 75

Галлюцинаторный синдром 270
Галлюцинации, влияние налоксона 142, 330—331
Галоперидол, влияние на выделение пролактина 196

Галоперидол, влияние на cGMP 231
— — — энкефалины 222
— и обмен дофамина 264
— — β-эндорфин, сравнительный анализ действия 112—114
— поведенческие эффекты 112
ГАМК 171, 209, 218
— в мозжечке 228—229
— — стрионигральном тракте 219, 220
— — хвостатом ядре 225—226
— и мусцимол 44
Гамма-аминомасляная кислота *см.* ГАМК
Ген, первичный 40
Гидроцефалокринный механизм транспорта 27
«Гиперчувствительность, связанная с неиспользованием» 260
Гипоталамус, деафферентация 194, 195
— энкефалины 158
Гипофиз, влияние эндорфинов 178—183, 185—191
— энкефалины 99, 185—191
Гипофизэктомия, влияние на акупунктурную анальгезию 350
— — — эндорфины 99
ГМФ циклический *см.* Циклический GMP (cGMP)
Гормон роста, выделение на акупунктурную анальгезию 350

Дексаметазон 181—182
Декстрорфан 265, 266, 268
Дигидроморфин и опиатные рецепторы 272, 273
— стереоспецифическое связывание 264, 265
3,4-Диоксифенилуксусная кислота 231
— — в стриатуме влияние D-Ala-метионин-энкефалинамида 204, 237—240
Диэнцефалон, содержание опиоидных пептидов 101
— энкефалин-положительные нейроны 64
Диэтилдитиокарбамат, подавление самостимуляции 299
ДНК, профиль плавления 280
Дофамин, взаимодействие с энкефалинами 200, 207
— в мозжечке и хвостатом ядре 299
— — стриатуме 243, 248, 249
— — стрионигральном пути 218, 219, 221
— и морфин 200
— обмен, влияние D-Ala-метионин-энкефалинамида 204—207
— — — морфина и галоперидола 264
— подавление секреции пролактина 194, 197
— рецепторы в стриатуме 264
Дофаминэргический путь, влияние D-Ala-метионин-энкефалинамида, 239
— — в стриатуме, влияние энкефалинэргической системы 258
Дэйла гипотеза 25

Желудочно-кишечный тракт, энкефалинсодержащие нейроны 68

Зависимость и эндогенные опиаты 53—54

Иглоукалывание *см.* Электроакупунктура
Интернейроны энкефалинсодержащие 94

Каиновая кислота, влияние на аденилатциклазу 232
— — — — cGMP 230—233
— — — — гуанилатциклазу 232
— — инъекция в стриатум 257, 258
Каллидин 23
Кардиолипин 282, 284
Карнозин 22
Кататонический синдром 326
Кататония и гипотермия 328
— связь с анальгезией 327—330
Катепсин 22
Каудопутамен энкефалины 128
Кетоциклазотоцин 270
Кининоген 23
Клазопин 221
Клетки APUD, концепция 35—36, 40
Клетки, захватывающие и декарбоксилирующие предшественники аминов *см.* Клетки APUD
Колхицин, выявление энкефалин-положительных нейронов 63—68
— при изучении флуоресценции энкефалинов и нейротензина 82
Кортикостероиды, влияние на опиатную активность в гипофизе 180
Кровь, эндорфины 190—191, 308—313

Леваллорфан 265, 266
Лейцин-энкефалин *см.* Лей-энкефалин
Лей-энкефалин *см. также* Энкефалины, Эндорфины
— антисыворотка 81—82
— в анальгезии 327
— — подкреплении навыка 20
— — стриатуме 248—258
— отделение от мет-энкефалина 149—150
— радиоиммунологический тест 118—119, 248—250
— радиорецепторный тест 250
— рецепторы в стриатуме 244—248
Лимбическая система 204, 205
Липиды в регуляции синтеза РНК 282—284
β-Липотропин и АКТГ 135—138
— — β-эндорфин 137
— иммуногистохимический анализ 134—137
— содержание в мозгу 134
— структура 36
β-ЛПГ *см.* β-Липотропин
Люлиберин, ср. с α-МСГ и фактором половой агглютинабельности 39

Мет-энкефалин (метионин-энкефалин) см. также Эндорфины; Энкефалины
— аденилатциклаза 291
— антисыворотка 81—82
— в анальгезии 327—328
— — спинном мозгу 66
— — стриатуме 222
— деградация 200
— действие в vas deferens 289—290
— отделение от лей-энкефалина 149—150
— распределение 87—92
Миндалина, центральное ядро 80
Мозг, β-липотропин 133—134
— промежуточный *см.* Диэнцефалон
— ренин-ангиотензиновая система 22
— ствол, опиатные рецепторы 273
— — распределение энкефалинов и нейротензина 87—92
— β-эндорфин 99
— энкефалин-положительные волокна 63—68
— энкефалины 99
Мозжечок 26—27
— возбуждающий фактор 26
— содержание ГАМК 228, 229, 233
— — cGMP 228—241
— тракт в стриатум 229
Морфин в анальгезии 328
— влияние на cGMP 235
— зависимость, влияние на содержание энкефалинов 172—175
— и аденилатциклаза 291
— — cGMP 235, 241
— — дофамин 200
— — мет-энкефалин 286—293
— — норадреналин 200
— — β-эндорфин 277—284
Моторная активность и эндогенные опиоиды 53
α-МСГ 35
β-МСГ, структура 36
Мускарин и ацетилхолин 44
Мусцимол, влияние на cGMP 234
— и ГАМК 44
Мышиный vas deferens 289

Налоксон в изучении анальгезии 347
— влияние на галлюцинации 142, 330—331
— и D-Ala-метионин-энкефалинамид 204
— — отвращение к привычному наркотику 355
— — электроакупунктура 355
— — эндорфины 316
— обращение анальгезии 287
Налтрексон, взаимодействие с β-эндорфином 194—195
— и D-Ala-метионин-энкефалинамид 236—237, 238
— — эндорфины 316
Нейрогормоны 15—28
Нейролептические препараты 229
Нейропептиды *см* Нейрогормоны
Норадреналин и морфин 200
Норадренэргическая система кортикальная влияние D-Ala-метионин-энкефалинамида 208

Обезболивание *см.* Анальгезия
Обучение, нейропептиды 21, 304
6-Оксидофамин, влияние на рецепторы энкефалинов 254, 255
Опиаты эндогенные *см.* Эндорфины, Энкефалины
Отвращение к привычному наркотику и налоксон 355

Память долговременная, усиление энкефалином 305
Пептид, вызывающий сокращение кишки 23
Пептидилдипептидаза 58—60

Пептиды, индуцированные обучением 21
— цветовой дискриминации 21
Поведение, влияние галоперидола 112
— подкрепленное пищей, подавление энкефалинами 304
— эмоциональное и энкефалины 163
Поведенческие реакции на эндорфины 112—116
Подкрепление с усилением и снижением побуждения 295
Полосатое тело *см.* Стриатум
Пролактин, секреция, влияние дофамина 194, 197
— — — эндорфинов 192—198
— эффект галоперидола 196

Радиоиммунологический метод выявления лей-энкефалина 118—119, 133, 165—177, 248—250
Радиорецепторный метод выявления лей-энкефалина 133, 250
Реактивность перекрестная антисывороток 94, 98, 248, 249
— — — измерение 119
— — — к энкефалину с миелином 107
Рецепторы опиатов *см.* Эндорфины, рецепторы; Энкефалины, рецепторы
РНК, синтез, влияние липидов 282—284

Серотонин в антиноцицептивной системе организма 358
Синапсы аксон-аксонные 176, 258, 316
Слуховая система и энкефалины 89
Соматостатин в анальгезии 323
— подавление эффектов эндорфинов 19
Спинно-мозговая жидкость, нейропептиды 27
Стресс, индукция анальгезии 138
Стриатум, дофамин 243
— инъекция каиновой кислоты 257—258
— лей-энкефалин 248—258
— локализация эндорфинов 254—258
— мет-энкефалины 222
— рецепторы дофамина 264
— — энкефалинов 239, 254, 255
— связь с мозжечком 229
— эндорфины 243—262
— — выявление 248—254
— энкефалины 170—172

Трифосфатдилинозит 283, 284

Фактор Fc
Фиксация ткани нагреванием 101
Фиксация ткани перфузией формальдегидом 103
Фолча экстракт 409
Фосфатидилсерин 283
Фосфатидилхолин 283, 284
Фосфатидилэтаноламин 283, 284

Хвостатое ядро, влияние энкефалинов 237—240
— — ГАМК 225—226
— — ГАМК-эргические нейроны 225
— — действие энкефалинов 239
— — дофамин 229
— — каудато-мозжечковый тракт 229
Холинацетилаза 257
Хроматин 277, 278
Хроматография аффинная для мет-энкефалина 156
— жидкостная под высоким давлением для энкефалинов 148—154
— обратно фазная для нейропептидов 153
— тонкослойная для мет-энкефалина 161

Цереброзидсульфат 284
Циклазоцин 143, 331
Циклический GMP (cGMP) в мозжечке 228—241
— — — — влияние апоморфина 241
— — — — — каиновой кислоты 230—234
— — — — — D-Ala-метионин-энкефалинамида 237—241
— — — — — морфина 235
— — — — — мусцимола 234

Шизофрения и β-эндорфин 115

Эйфорический синдром 270
Электроакупунктура при анальгезии 347—348
— и гипофизэктомия 350
— — облегчение боли 344
— — налоксон 355
— — эндорфины 344—353
— у алкоголиков, курильщиков и у наркоманов 354—355

Электростимуляция мозга и эндорфины 141, 320
Электроэнцефалограмма *см.* ЭЭГ
α-эндорфин в гипофизе 187
β-эндорфин 137—138
— биологическая активность 48, 49
— в диэнцефалоне 101
— — обезболивания 315, 324
— взаимодействие с налтрексоном 194—195
— высвобождение с АКТГ 116
— действие на наркомана 333—343
— — — ЭЭГ
— и галоперидол различие эффектов 112—114
— — β-липотропин 137—138
— — обмен ацетилхолина 224—226
— — синтез РНК 279
— — скорость дыхания 338
— — FK 33-824 215
— — шизофрения
— иммуноцитохимическое выявление 98—101
— локализация и функция 99—116
— стабильность 102
— структура 36
— субъективные эффекты 340
— толерантность 111
— эпилептогенное действие 110
— β-Эндорфинподобная иммунореактивность 104—108
γ-Эндорфин 97
Эндорфины *см. также* Энкефалины
— абстинентный синдром 189
— антагонизм соматостатина
— в гипоталамусе 158
— — гипофизе, влияние половой зрелости 187
— — крови 190—191, 308—313
— — моче 308—313
— — психических расстройствах 326—331
— — СМЖ после электростимуляции 320
— — стриатуме 243—262
— — — выявление 248—254
— — — локализация 254—258
— — эндогенном обезболивании 314—324
— влияние гипофизэктомии 99
— деградация в клетках эндотелия 56—60
— и акупунктурная анальгезия 344—353
— — высвобождение пролактина 192—198
— — гормоны гипофиза 178—183
— — хорошее самочувствие 294—306
— — энкефалины 98
— поведенческие эффекты 111—116
— распределение 46—47
— рецепторы 243—262, 270—275
— содержание в гипофизе 185—187
— содержание в СМЖ при различных болях 319
— — при психозах 20
— — снижение при хронических болях 320, 321
— толерантность 53, 111
— фармакологическое изучение 131
— функция в гипофизе 185—191
Энкефалины *см. также* Эндорфины
— антисыворотка 81—82
— — применение 84—92
— — специфичность 168—169
— в бледном шаре 125—129
— — гипофизе 99, 185—191
— — диэнцефалоне 101
— — интернейронах 94
— — каудопутамене 128
— — концевой полоске 84
— — мозгу 99
— — системе тройничного нерва 118—129
— — стволе мозга 87—92
— — участках мозга при самостимуляции 298—304
— — экстрапирамидной системе 125
— взаимодействие с дофамином 200—210
— влияние на выделение гормона роста 178
— выявление в телах нейронов 128
— деградация 57—59, 102
— действие на хвостатое ядро 239
— и вещество Р 75
— — слуховая система 89
— — экстрапирамидная активность 163
— — эмоциональное поведение 163
— — эндорфины 98—99
— иммуногистохимическая локализация 83—92
— иммунореактивность в группах клеток 63—64
— — — телах нейронов 63
— инактивация 56—60
— история открытия 44—46
— метаболизм 47—48
— модификация структуры 37—38
— относительная активность 48, 50
— подавление подкрепляемого пищей поведения 304
— радиоиммунологический тест 133, 165—177
— радиорецепторный тест 133
— разделение методом жидкостной

хроматографии под высоким давлением 149—154
— распределение 46—47
— — и биосинтез 155—164
— рецепторы 254, 258
— содержание в стриатуме 170—172
— — влияние микроволнового облучения 169—170
— — у морфинозависимых крыс 172—175
— толерантность 53
— усиление долговременной памяти 305—306
— функция 131
— экстракция и определение количества 132
Эпилептообразный разряд 110
Эрготамин 357
Эрготионеин 26
Эторфин 43
— при изучении анальгезии 328
ЭЭГ, влияние эндорфина 110—11

Предисловие ре
Предисловие .
Список авторов
Активные пепти
Химия регуляци
Развитие конце
Д. Хьюс)
Инактивация эн
тивируемых
Н. Т. Бойд
Иммуногистохи
хансон, Т.
Энкефалины и
тификация
хар, С. Сн
β-Эндорфин. Л
ские эффе
он, Е. Фр
Н. Линг,
Нейроны, соде
мидной си
Эндорфины. β
мическое
Использование
изучения
Энкефалины
Дж. С. Хо
Радиоиммуно
цин-энкеф
кислотой
Некоторые вз
(А. Санта
С. Ферри)
Дальнейшее
(Б. М. Ко
Участие гипо
(А. Гайд

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редактора перевода 5

Предисловие 7

Список авторов 9

Активные пептиды в нервной ткани. Исторические перспективы. (*Г. Цетлер*) 15

Химия регуляции нейропептидами. (*Р. Гайгер*) 35

Развитие концепций опиатных рецепторов и их лигандов. (*Г. В. Костерлиц, Д. Хьюс*) 43

Инактивация энкефалинов. Влияние очищенных пептидилдипептидаз и культивируемых клеток эндотелия человека. (*Е. Ж. Эрдос, А. Р. Джонсон, Н. Т. Бойден*) 56

Иммуногистохимическое распределение энкефалиновых нейронов. (*О. Йохансон, Т. Хёкфельт, Р. П. Эльде, М. Шульцберг, Л. Терениус*) . . . 61

Энкефалины и нейротензин. Иммуногистохимическая локализация и идентификация амигдалофугального тракта. (*Дж. Юл, Р. Гудмен, М. Кухар, С. Снайдер*) 79

β-Эндорфин. Локализация в клетке, электрофизиологические и поведенческие эффекты. (*Ф. Е. Блюм, Дж. Россье, Е. Л. Ф. Баттенберг, А. Байон, Е. Френч, С. Дж. Хенриксен, Г. Р. Сиггинс, Д. Сегал, Р. Браун, Н. Линг, Р. Гуиллемин*) 97

Нейроны, содержащие энкефалин и вещество Р в тройничной и экстрапирамидной системах. (*А. К. Куелло*) 118

Эндорфины. β-ЛПГ и АКТГ: биохимическое, фармакологическое и анатомическое исследование. (*Х. Акил, С. Уотсон, Ф. Бергер, Дж. Барчас*) 131

Использование жидкостной хроматографии под высоким давлением для изучения энкефалинов. (*Дж. Л. Мик, Т. П. Бохан*) 148

Энкефалины мозга крыс. Распределение и биосинтез. (*Х.-Ю. Т. Янг, Дж. С. Хонг, В. Фратта, Е. Коста*) 155

Радиоиммунологический тест на энкефалины. Содержание метионин- и лейцин-энкефалина в мозгу морфинозависимых и поврежденных каиновой кислотой крыс. (*С. Р. Чайлдерс, Р. Шварц, Дж. Т. Койл, С. Х. Снайдер*) 165

Некоторые взаимоотношения между эндорфинами и гормонами гипофиза. (*А. Сантагостино, Д. Коччи, Г. Джианьони, Е. Гори, Е. Мюллер, С. Ферри*) 178

Дальнейшее изучение природы и функции гипофизарных эндорфинов. (*Б. М. Кокс, Е. Р. Бейзман, Тсун-пинг Су, О. Г. Осман, А. Голдстайн*) 185

Участие гипоталамических эндорфинов в контроле выделения пролактина. (*А. Гайдотти, Л. Грэндисон*) 192

Влияние энкефалинов на метаболизм катехоламинов в центральной нервной системе крыс. (*С. Алгери, Н. Брунелло, Ц. Кальдерини, А. Консолациони*) 200

Некоторые фармакологические свойства FK33-824, стабильного, активного при пероральном введении аналога метионин-энкефалина. (*Р. Ц. Хилл, Д. Рёмер, Х. Х. Бюшер*) 212

Взаимодействие между энкефалинэргическими и другими нейронными системами. (*Е. Коста, В. Фратта, Дж. С. Хонг, Ф. Морони, Х.-Ю. Т. Янг*) 217

Стриато-церебеллярный тракт, контролирующий содержание циклического GMP в мозжечке. Роль дофамина, гамма-аминомасляной кислоты и энкефалинов. (*Ж. Биггио, М. Ж. Корда, М. Казу, Г. Л. Гесса*) . . 228

Эндорфины и рецепторы эндорфинов в стриатуме, связь с дофаминэргическими нейронами. (*Ж. Шварц, А. Поллард, С. Ллоран, Б. Мальфрой, С. Грос, Ф. Прадельс, Ф. Драй*) 243

Синаптическая локализация опиатных рецепторов в стриатуме крыс. (*А. Каренци, В. Фриджени, Д. Делла Белла*) 264

Опиатные рецепторы. Различное сродство к лигандам в разных участках мозга. (*Д. Делла Белла, Ф. Казаччи, А. Сасси*) 270

Действие морфина и β-эндорфина на синтез РНК. (*Н. М. Ли, Г. Г. Ло, Ч.-Х. Ли*) 277

Сравнительные исследования морфина и метионин-энкефалина in vivo и in vitro. Зависимый от генотипа ответ у двух различных линий мышей. (*Г. Раканьи, Ф. Бруно, Е. Юлиано, Д. Лонжиаве, В. Манделли, Ф. Берти*) 286

Эндорфины мозга и ощущение хорошего самочувствия: психобиологическая гипотеза. (*Л. Стайн, Дж. Беллуци*) 294

Характеристика опиатоподобных соединений в крови и моче. (*М. Вюстер, П. Лот, Р. Шульц*) 308

Роль эндорфинов в эндогенном обезболивании. (*Л. Терениус*) 315

Указывают ли поведенческие эффекты эндорфинов на их участие в психических расстройствах? (*А. Герц, Дж. Блёзиг, Г. Эмрих, К. Кординг, С. Пири, А. Кёллинг, Д. Церсен*) 326

β-Эндорфин. Субъективные и объективные эффекты при острой наркотической абстиненции у человека. (*Д. Кэтлин, К. К. Хьюи, Г. Ло, Ч.-Х. Ли*) 333

Опосредуют ли эндорфины акупунктурную анальгезию? (*Б. Померанц*) 344

Влияние налоксона на вызываемую акупунктурой анальгезию у наркоманов. (*Е. Малиция, Дж. Андреуччи, Р. Сербо, Дж. Коломбо*) . . . 354

Морфиноподобные факторы в спинномозговой жидкости пациентов с головными болями. (*Ф. Сикутери, Б. Ансельми, Ц. Курради, С. Мичелацци, А. Сасси*) 357

Предметный указатель 361

й нерв-
Консо-
. . 200
ктивного
Ц. Хайл,
. . . 212
ными си-
Ф. Т. Янг) 217
лического
кислоты и
са) . . . 22
минэргиче-
Мальфрой,
. . . . 243
туме крыс.
. 264
их участках
. 270
и, Г. Г. Ло,
. 277
а in vivo и
иний мышей.
В. Манделли, 28
. . . . .
биологическая 29
. . . . .
е. (М. Вюстер, 308
. 315
. . . . .
с) . . . .
частие в психи-
их, К. Кординг, 326
. . . . .
. 333
строй наркотиче-
Г. Ло, Ч.-Х. Ли) 344
(Б. Померанц)
. 354
езию у наркома-
Коломбо) . . . 357
ациентов с голов-
Эи, С. Мичелацци,
. 36

3 р. 40 к.

1087
2

ЭНДОРФИНЫ